

**Marcos Leite Santoro**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RECEPTORES E  
REGULADORES DE NEUROTRANSMISSORES EM UM NOVO  
MODELO ANIMAL PARA ESQUIZOFRENIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo  
2012**

**Marcos Leite Santoro**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RECEPTORES E  
REGULADORES DE NEUROTRANSMISSORES EM UM NOVO  
MODELO ANIMAL PARA ESQUIZOFRENIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de Medicina,  
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Sintia Iole Belangero

**Co-Orientador:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa C. Abílio

**São Paulo**

**2012**

Santoro, Marcos Leite

**Análise da expressão de genes receptores e reguladores de neurotransmissores em um novo modelo animal para esquizofrenia/Marcos Leite Santoro.-- São Paulo, 2012.**

xxiii, 81f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Morfologia.

Título em inglês: Analysis of gene expression of receptors and regulators of neurotransmitters in an animal model for schizophrenia.

1. Esquizofrenia. 2. Linhagem SHR. 3.expressão gênica. 4. PCRarray.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**Programa de Pós-Graduação em Morfologia/Genética**

**Chefe do Departamento de Morfologia e Genética:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sima Godosevicius Katz

**Chefe da Disciplina de Genética:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília de Arruda Cardoso Smith

**Coordenador do Curso de Pós-graduação em Morfologia e Genética:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janete Maria Cerutti

**Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina**

**Reitor:** Prof. Dr. Walter Manna Albertoni

**Vice-reitor:** Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith

**Chefe de Gabinete:** Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

**Este estudo foi desenvolvido nos seguintes locais:**

Disciplina de Genética - Departamento de Morfologia e Genética - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

Laboratório Interdisciplinar de Neurociência Clínica (LINC) - Departamento de Psiquiatria - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

## **Auxílio Financeiro:**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processo: 2010/08968-6; 2010/13859-1

**ORIENTADORA**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> SÍntia Iole Belangero

Professora Adjunta

Disciplina de Genética

Departamento de Morfologia e Genética

Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

**CO-ORIENTADORA**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Costhek Abílio

Professora Adjunta

Departamento de Farmacologia

Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

## **Grupo de pesquisa**

### **Colaboração:**

#### **Disciplina de Genética - Departamento de Morfologia e Genética - UNIFESP**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília de Arruda Cardoso Smith

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Isabel Melaragno

Dr<sup>a</sup> Patrícia Natália Oliveira da Silva

MS Vanessa Kyomi Arashiro Ota

Bach. Vinícius Colonese Mrad

Acad. Letícia Maria Nery Spíndola

#### **Departamento de Psiquiatria - UNIFESP**

Prof. Dr. Jair de Jesus Mari - Professor Titular

Prof. Dr. Rodrigo Affonseca Bressan - Professor Adjunto

Dr. Ary Gadelha de Alencar Araripe Neto - Mestrando

#### **Departamento de Farmacologia - UNIFESP**

Dr<sup>a</sup> Mariana Calzavara – Pós-doutoranda

MS Camila Santos – Doutoranda

Acad. Mariana Diana – Iniciação Científica



**Marcos Leite Santoro**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RECEPTORES E  
REGULADORES DE NEUROTRANSMISSORES EM UM NOVO  
MODELO ANIMAL PARA ESQUIZOFRENIA**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iscia Teresinha Lopes Cendes

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Deborah Suchecki

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elisa Brietzke

Aprovada em: 29/08/2012

## Dedicatória

*Aos meus pais, meu alicerce, e à minha irmã, minha maior companheira, pela construção do meu caráter e pelo apoio que sempre me dedicaram.*

*À minha avó Maria - em memória- pela inspiração e exemplo de vida. Gostaria que ela estivesse aqui para corrigir meus erros de português.*

## Agradecimentos

À minha orientadora, **Profª Drª Sântia Iole Belangero**, pelos ensinamentos em genética, por ter me acolhido em São Paulo, pela disponibilidade mesmo durante a gravidez, e por ser um exemplo de ótima pesquisadora.

Aos meus **pais e irmã**, que desde o início da minha vida acadêmica me apoiaram e nunca deixaram eu desistir dos meus sonhos. De longe ou de perto sempre me passaram muito carinho e conforto.

Aos meus **avós paternos e maternos**, os quais formaram duas famílias maravilhosas, meus alicerces.

Aos meus tios **Willian e Vera, Celso e Maria Amélia** por sempre incentivarem minha carreira acadêmica.

Aos meus padrinhos, **tio Guia e tia Zélia**, e aos meus primos, **Fábio e Felipe**, por me receberem de braços abertos em São Paulo e pela relação de amizade que sempre tivemos.

À minha namorada, **Maricota**, a única capaz de me acalmar e me fazer rir nos dias mais difíceis. Obrigado, pela ajuda direta e indireta durante o meu mestrado, por participar das minhas experiências gastronômicas sem reclamar e pelo amor e companheirismo que espero durar por muito tempo.

À minha grande amiga, **Van Ota**, por ter me ensinado muito de genética, estatística e esquizofrenia, pelo exemplo de pessoa trabalhadora, e por ser minha psicóloga acadêmica nos momentos de desilusão.

Aos meus amigos de república Só-Kanela (Botucatu), **Panda, Kumbuka, e Boi** (Pelanka, Kudo, etc.), que levarei para sempre como irmãos. Agradeço por cada festa que não lembramos de nada, por cada conversa, por cada campeonato ganho (ou perdido), enfim, por todas histórias engraçadas ou bizarras que vivemos juntos.

Às minhas amigas, **Loka, Akusada e Kuentro**, pela amizade e por tudo o que compartilhamos em Botucatu.

Aos amigos da Genética, **Leo, Fê Wis, Paty, Dani, Van, Letícia, Sintia, Carol, Fê Bellucco, Zulu e Mari (Leal)**, pelas risadas na cozinha e pelos brigadeiros.

Aos funcionários do departamento, **Mara, Silvinha, Cleide e Severina**, por terem me auxiliado no desenvolvimento do projeto.

Às Professoras **Dr<sup>a</sup> Gianna, Dr<sup>a</sup> Maria Isabel e Dr<sup>a</sup> Marília**, pela disponibilidade em tirar dúvidas, e pelo exemplo de docência.

À minha co-orientadora, **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Abílio**, pelo ensinamento na área de modelo animal, e por compartilhar todas as emoções durante os resultados preliminares e finais deste projeto.

À **Camilão**, parceira de experimentos, pessoa com quem tive grande afinidade e entrosamento acadêmico. Tenho certeza que nossa dupla irá render muitos trabalhos.

À **Maridiana**, peça fundamental no desenvolvimento do meu mestrado, agradeço pelos longos dias de tratamento e sacrifício dos animais.

Aos **alunos da professora Vanessa Abílio**, os quais me ajudaram durante os 30 dias de tratamento.

Ao **Diego**, por toda ajuda na análise estatística.

Aos médicos, **Rodrigo Bressan e Ary Gadelha**, por terem ajudado no desenho inicial e no desenvolvimento deste projeto.

Ao **departamento de Morfologia e Genética, departamento de Psiquiatria e ao LiNC** pela infraestrutura cedida.

À **Banca de qualificação e à banca examinadora**, pelas correções e conselhos na etapa final deste projeto.

À **FAPESP**, por me proporcionar o auxílio financeiro, concedendo uma bolsa de mestrado.

# Sumário

## ÍNDICE

Dedicatória.....	ix
Agradecimentos.....	x
Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de símbolos e abreviações.....	xix
Resumo.....	xxiii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	2
2.1 Apresentação da doença .....	2
2.2 Genética e esquizofrenia.....	2
2.3 Genes que codificam receptores e reguladores de neurotransmissores .....	3
2.4 Tratamento de esquizofrenia .....	5
2.5 Expressão gênica em esquizofrenia .....	7
2.6 Modelos animais de esquizofrenia .....	8
3 OBJETIVOS .....	11
3.1 Objetivos gerais: .....	11
3.2 Objetivos específicos: .....	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	13

4.1	Preparação dos animais .....	13
4.2	Tratamento.....	13
4.3	Coleta do material biológico e eutanásia.....	14
4.4	Extração de RNA.....	15
4.5	Extração de DNA.....	16
4.6	PCRarray.....	17
4.7	Inclusão/exclusão de genes alvo e endógenos para o estudo da expressão gênica.....	20
4.8	Análise estatística .....	22
4.8.1	Expressão gênica .....	22
4.8.2	Interação das regiões cerebrais e linhagem .....	23
4.8.3	Rede de interação dos genes diferencialmente expressos .....	23
4.8.4	Correlação sangue e cérebro .....	24
5	RESULTADOS.....	25
5.1	Pesagem dos animais ao longo do tratamento .....	25
5.2	SHR x Wistar tratados com veículo .....	25
5.2.1	Interação dos genes diferencialmente expressos no CPF e NAcc.....	30
5.3	SHR não tratado x SHR tratado.....	30
5.4	Correlação sangue x cérebro.....	42
6	DISCUSSÃO .....	44
6.1	Genes diferencialmente expressos entre as linhagens Wistar e SHR .....	47
6.1.1	<i>Gad2</i> .....	47

6.1.2	<i>Chrn4</i> .....	47
6.1.3	<i>Slc5a7</i> .....	48
6.1.4	<i>Qrfpr</i> .....	49
6.1.5	<i>Tacr3</i> .....	49
6.1.6	<i>Sstr4</i> .....	50
6.1.7	Rede de interação entre os genes diferencialmente expressos entre as linhagens SHR e Wistar .....	50
6.2	Correlação sangue e regiões cerebrais .....	53
6.3	Genes diferencialmente expressos entre SHR tratado e não tratado com antipsicótico .	53
6.3.1	<i>Sstr4</i> .....	53
6.3.2	<i>Brs3</i> .....	54
6.3.3	<i>Prnal</i> .....	55
6.3.4	<i>Drd2</i> e <i>Drd3</i> .....	57
6.4	Limitações do estudo .....	57
7	CONCLUSÃO .....	59
8	ANEXOS .....	61
8.1	Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP (processo 1157/10).	61
8.2	Anexo II - Artigo submetido ao periódico Schizophrenia Bulletin.....	63
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
10	ABSTRACT.....	76
11	FONTES CONSULTADAS .....	77

12	APÊNDICES.....	78
12.1	Apêndice I – Artigo aceito para publicação .....	78
12.2	Apêndice II - Artigo submetido.....	79
12.3	Apêndice III - Artigo submetido .....	80
12.4	Apêndice IV - Artigo submetido .....	81



## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Cérebro de rato, destacando as regiões que dissecadas em nosso estudo.....	15
<b>Figura 2..</b> a) Gel de agarose 1% para verificação a integridade do RNA. b) Picos gerados pelo aparelho Bioanalyser (Agilent®) referentes às frações 18S e 28S.. .....	16
<b>Figura 3.</b> Esquema da placa de PCRarray utilizada. ....	19
<b>Figura 4.</b> ANOVA de duas vias realizada para o gene <i>Tacr3</i> .....	30
<b>Figura 5.</b> Conexão entre os genes diferencialmente expressos no CPF do SHR em relação ao Wistar.. .....	51

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Genes de neurotransmissão presentes na placa de ratos (PARN – 060) do <i>Neurotransmitter Receptors and Regulators PCRarray</i> . ....	18
<b>Tabela 2.</b> Genes estudados em cada tecido para a comparação Wistar x SHR ambos tratados com veículo. ....	21
<b>Tabela 3.</b> Genes estudados em cada tecido para a comparação entre o grupo SHR tratado com veículo e os grupos SHR tratados com antipsicótico. ....	21
<b>Tabela 4.</b> Peso dos animais durante o tratamento. ....	25
<b>Tabela 5.</b> Resultados da expressão gênica no córtex pré-frontal entre as linhagens SHR e Wistar tratados com veículo.....	26
<b>Tabela 6.</b> Resultados da expressão gênica no <i>nucleus accumbens</i> entre as linhagens SHR e Wistar tratados com veículo. ....	28
<b>Tabela 7.</b> Resultados da expressão gênica no sangue periférico entre as linhagens SHR e Wistar tratados com veículo.....	29
<b>Tabela 8.</b> Resultados da expressão gênica no córtex pré-frontal entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com risperidona.....	31
<b>Tabela 9.</b> Resultados da expressão gênica no <i>nucleus accumbens</i> entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com risperidona.....	33
<b>Tabela 10.</b> Resultados da expressão gênica no sangue periférico entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com risperidona.....	34

<b>Tabela 11.</b> Resultados da expressão gênica no córtex pré-frontal entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com clozapina. ....	35
<b>Tabela 12.</b> Resultados da expressão gênica no <i>nucleus accumbens</i> entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com clozapina. ....	37
<b>Tabela 13.</b> Resultados da expressão gênica no córtex pré-frontal entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com haloperidol. ....	39
<b>Tabela 14.</b> Resultados da expressão gênica no <i>nucleus accumbens</i> entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com haloperidol. ....	41
<b>Tabela 15.</b> Genes diferencialmente expressos entre a linhagem Wistar e SHR encontrados no presente estudo. Resumo dos dados da literatura quanto à esquizofrenia, outras condições psiquiátricas e estudos em modelos animais, bem como as possíveis alterações fisiopatológicas relacionadas a esses genes.....	45
<b>Tabela 16.</b> Genes diferencialmente expressos entre SHR tratado e não tratado com antipsicóticos encontrados no presente estudo. Resumo dos dados da literatura quanto à esquizofrenia, efeito de antipsicóticos e estudos em modelos animais, bem como o possível efeito deste tratamento nesses genes.....	46

## Lista de abreviaturas e símbolos

21G	<i>21 Gauge</i>
5-HTR	<i>5-HYDROXYTRYPTAMINE RECEPTOR</i>
5-HTR2A	<i>5-HYDROXYTRYPTAMINE RECEPTOR 2A</i>
A	Adenina
Abat	<i>4-aminobutyrate aminotransferase</i>
Ache	<i>Acetylcholinesterase</i>
Actb	<i>Actin, beta</i>
Anxa9	<i>Annexin A9</i>
APP	Peptídeo precursor da beta-amilóide
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
Brs3	<i>Bombesin-like receptor 3</i>
C	Citosina
Cckar	<i>Cholecystokinin A receptor</i>
Cckbr	<i>Cholecystokinin B receptor</i>
Chat	<i>Choline acetyltransferase</i>
Chrm1	<i>Cholinergic receptor, muscarinic 1</i>
Chrm2	<i>Cholinergic receptor, muscarinic 2</i>
Chrm3	<i>Cholinergic receptor, muscarinic 3</i>
Chrm4	<i>Cholinergic receptor, muscarinic 4</i>
Chrm5	<i>Cholinergic receptor, muscarinic 5</i>
CHRM <sub>s</sub>	<i>Cholinergic receptor, muscarinic type</i>
Chrna1	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)</i>
Chrna2	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 2 (neuronal)</i>
Chrna3	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3</i>
Chrna4	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4</i>
Chrna5	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5</i>
Chrna6	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 6</i>
CHRNA7	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (human)</i>
Chrn1	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)</i>
Chrn2	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 (neuronal)</i>
Chrn3	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, beta 3</i>
Chrn4	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, beta 4</i>
Chrnd	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, delta</i>
Chrne	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, epsilon</i>
Chrng	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, gamma</i>
CHT1	<i>Choline Transporter 1 (Slc5a7)</i>
Comt	<i>Catechol-O-methyltransferase</i>
CPF	Córtex Pré-frontal
CREB1	<i>CAMP responsive element binding protein 1</i>
Ct	Cycle threshold
D2	<i>Dopamine receptor D2 (Drd2)</i>
D3	<i>Dopamine receptor D3 (Drd3)</i>

DAAM2	<i>Disheveled-associated activator of morphogenesis 2</i>
DGCR2	<i>DIGEORGE SYNDROME CRITICAL REGION GENE 2</i>
DISC1	<i>Disrupted in schizophrenia 1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Drd1a (Drd1)	<i>Dopamine receptor D1A</i>
Drd2	<i>Dopamine receptor D2</i>
Drd3	<i>Dopamine receptor D3</i>
Drd4	<i>Dopamine receptor D4</i>
Drd5	<i>Dopamine receptor D5</i>
DTNBP1	<i>dystrobrevin-binding protein 1</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FDR	<i>False Discovering Rate</i>
FR	<i>Fold Regulation</i>
FT	<i>Fator de Transcrição</i>
G	<i>Guanina</i>
GABA	<i>Gamma-AminoButyric Acid</i>
Gabra1	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1</i>
Gabra2	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2</i>
Gabra3	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 3</i>
Gabra4	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 4</i>
Gabra5	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5</i>
Gabra6	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 6</i>
Gabrb2	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2</i>
Gabrb3	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3</i>
Gabrd	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta</i>
Gabre	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon</i>
Gabrg1	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 1</i>
Gabrg2	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2</i>
Gabrp	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, pi</i>
Gabrq	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, theta</i>
Gabbr1	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 1</i>
Gabbr2	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 2</i>
GAD	<i>Glutamate decarboxylase</i>
Gad1	<i>Glutamate decarboxylase 1</i>
Gad2	<i>Glutamate decarboxylase 2</i>
Galr1	<i>Galanin receptor 1</i>
Galr2	<i>Galanin receptor 2</i>
Galr3	<i>Galanin receptor 3</i>
Gla1	<i>Glycine receptor, alpha 1</i>
Gla2	<i>Glycine receptor, alpha 2</i>
Gla3	<i>Glycine receptor, alpha 3</i>
Glr1b	<i>Glycine receptor, beta</i>
Gpr83	<i>G protein-coupled receptor 83</i>
Grpr	<i>Gastrin releasing peptide receptor</i>
H1	<i>Histamine receptor 1</i>

HKG	<i>Housekeeping genes</i>
Hprt1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
Htr3a	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3a</i>
i.c.v	<i>Intracerebroventricular</i>
i.p.	<i>Intraperitoneal</i>
Ldha	<i>Lactate dehydrogenase A</i>
LSD	<i>Lysergic acid diethylamide</i>
Maoa	<i>Monoamine oxidase A</i>
Mc2r	<i>Melanocortin 2 receptor</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NAcc	<i>Nucleus accumbens</i>
Nmur1	<i>Neuromedin U receptor 1</i>
Nmur2	<i>Neuromedin U receptor 2</i>
Npffr1	<i>Neuropeptide FF receptor 1</i>
Npffr2	<i>Neuropeptide FF receptor 2</i>
Npy1r	<i>Neuropeptide Y receptor Y1</i>
Npy2r	<i>Neuropeptide Y receptor Y2</i>
Npy5r	<i>Neuropeptide Y receptor Y5</i>
NRG1	<i>Neuregulin 1</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEP	<i>Primeiro Episódio Psicótico</i>
PPC	<i>Positive PCR Control</i>
PPI	<i>Prepulse Inhibition</i>
Ppyr1	<i>Pancreatic polypeptide receptor 1</i>
Prima1	<i>Proline rich membrane anchor 1</i>
Prlhr	<i>Prolactin releasing hormone receptor</i>
Prokr1	<i>Prokineticin receptor 1</i>
Prokr2	<i>Prokineticin receptor 2</i>
Qrfpr	<i>Pyroglutamylated RFamide peptide receptor</i>
RGDC	<i>Rat Genomic DNA Contamination</i>
RGS4	<i>Regulator of G protein signaling 4</i>
RIN	<i>RNA integrity</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Rpl13a	<i>Ribosomal protein L13A</i>
Rplp1	<i>Ribosomal protein, large, P1</i>
RT	<i>Reverse Transcription</i>
RTC	<i>Reverse Transcription Control</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription PCR</i>
SELENBP1	<i>Selenium-binding protein 1</i>
Slc5a7	<i>Solute carrier family 5 (choline transporter), member 7</i>
SP	<i>Sangue periférico</i>
Sstr1	<i>Somatostatin receptor 1</i>
Sstr2	<i>Somatostatin receptor 2</i>
Sstr3	<i>Somatostatin receptor 3</i>
Sstr4	<i>Somatostatin receptor 4</i>

Sstr5	<i>Somatostatin receptor 5</i>
Tacr1	<i>Tachykinin receptor 1</i>
Tacr2	<i>Tachykinin receptor 2</i>
Tacr3	<i>Tachykinin receptor 3</i>
TDAH	<i>Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade</i>
T	Timina
Th	<i>Tyrosine hydroxylase</i>
UFD1L	<i>Ubiquitin fusion degradation 1-Like</i>
Met	Metionina
Val	Valina
$\Delta$ Ct	<i>Delta cycle threshold</i>
$\Delta\Delta$ Ct	<i>Delta Delta cycle threshold</i>

## RESUMO

Recentemente, nosso grupo mostrou que a linhagem *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) apresentava uma série de comportamentos, classicamente, associados com modelos animais de esquizofrenia. O presente projeto propõe investigar se há diferença na expressão de genes de receptores e reguladores de neurotransmissores no tecido sanguíneo e duas regiões cerebrais (*nucleus accumbens* - NAcc e córtex pré-frontal - CPF) entre a linhagem de ratos SHR (N=8), modelo de esquizofrenia, e a linhagem de ratos Wistar, linhagem controle, (N=8), ambos tratados com veículo, e entre os grupos SHR tratado e não tratado com antipsicóticos (risperidona – N=8, clozapina – N=7, haloperidol – N=7). Nós utilizamos a técnica de *PCRarray* para verificar a expressão de 84 genes relacionados a neurotransmissão. Na comparação entre as linhagens SHR e Wistar encontramos quatro genes diferencialmente expressos no CPF (*Chrn4*, *Gad2*, *Qrfpr* e *Slc5a7*) e um no sangue (*Sstr4*). Além disso, observamos que o gene *Tacr3* apresenta uma expressão diminuída no CPF e aumentada no NAcc do SHR em relação ao Wistar e que esse gene está correlacionado positivamente entre o sangue e NAcc e negativamente entre o sangue e CPF dos animais SHR. Com relação aos grupos tratados com antipsicótico, encontramos três genes diferencialmente expressos no CPF do grupo clozapina (*Drd2*, *Drd3* e *Brs3*) e dois no CPF do grupo haloperidol (*Brs3* e *Sstr4*). Nosso trabalho apontou genes diferencialmente expressos entre as duas linhagens que estão envolvidos em importantes vias relacionadas à esquizofrenia, como o *Gad2* e o *Tacr3*, esse último, um potencial biomarcador para a condição do SHR. A comparação entre os grupos SHR não tratado e tratado com antipsicóticos apontou genes, possivelmente, relacionados ao efeito do antagonismo de receptores *D2-like* e associados à melhora no comportamento, como observado por nós anteriormente. Estes resultados demonstram semelhanças genéticas com a esquizofrenia nessa linhagem, além de apontar um potencial biomarcador e novos genes, possivelmente, envolvidos com o fenótipo do SHR e com resposta aos antipsicóticos.



# 1 INTRODUÇÃO

## **Apresentação:**

Este projeto de mestrado está vinculado a um grande projeto intitulado “*Investigação de marcadores genéticos e epigenéticos: uma abordagem translacional para o tratamento de esquizofrenia*”, um projeto interdisciplinar e multicêntrico envolvendo os Departamentos de Morfologia e Genética e de Psiquiatria, da Universidade Federal de São Paulo; o Departamento de Psiquiatria da USP/SP; o Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da USP/Ribeirão e o Centro de Atenção Integral em Saúde Mental (CAISM) (Vila Mariana) do Departamento de Psiquiatria da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. O objetivo desse grande estudo é a investigação de marcadores genéticos e epigenéticos para o tratamento da esquizofrenia, por meio do estudo da expressão e da metilação de genes de receptores de neurotransmissores, tanto em pacientes de primeiro episódio psicótico, quanto em um modelo animal de esquizofrenia, o *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR). A presente dissertação de mestrado propõe investigar a expressão em cérebro e sangue de genes receptores e reguladores de neurotransmissores nas linhagens de ratos Wistar (controle) e SHR, tratado e não tratado, cronicamente, com três antipsicóticos, amplamente utilizados na prática clínica. Os principais objetivos deste estudo foram: caracterizar a expressão de genes de neurotransmissão em um novo modelo animal para a esquizofrenia; verificar o efeito de drogas antipsicóticas na expressão desses genes e correlacionar a expressão gênica do sangue e das regiões cerebrais estudadas, possibilitando uma comparação entre os achados do estudo em animais e humanos.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Apresentação da doença**

A esquizofrenia é uma doença multifatorial que compreende um conjunto de sinais e sintomas de origem desconhecida. Ela é caracterizada por um complexo conjunto de distúrbios do pensamento e percepção como as alucinações e delírios (sintomas positivos), e redução do afeto e comportamento social (sintomas negativos) [1]. Essa doença apresenta uma incidência média de casos novos ao ano em torno de 1,5 por 10.000 habitantes [2], sendo mais frequente em homens do que em mulheres [2], e uma prevalência entre 0,3 a 1,6% na população [3].

Os indivíduos geralmente são acometidos no auge do seu potencial produtivo e o curso costuma ser crônico e debilitante. Segundo dados da organização mundial da saúde, a esquizofrenia é a 8ª principal causa de anos perdidos de vida saudável [4]. Essa doença representa o principal custo direto de tratamento entre os transtornos mentais, cerca de 1,3 a 2,5% do total de gastos em saúde em países ocidentais [5]. Em 2002, os custos totais da doença nos Estados Unidos foram estimados em U\$62,7 bilhões [6], e em 1998 no estado de São Paulo o custo total foi U\$191 milhões [7]. O dado mais recente sobre gasto em saúde com esquizofrenia no estado de São Paulo (2006), se refere ao custo de recaída dos pacientes, o qual encontrou um gasto médio de mais de R\$ 4 mil por pacientes [8].

### **2.2 Genética e esquizofrenia**

O maior fator preditor para a esquizofrenia é a existência de parentes de 1º grau afetados [9, 10], sendo que a concordância entre gêmeo monozigóticos é de 48% [11]. A taxa de recorrência entre parentes de 1º grau de um paciente com esquizofrenia gira em torno de 10% [9, 10] e a

herdabilidade está estimada em 64-83%, uma das mais altas entre doenças psiquiátricas [12, 13]. Esses dados mostram uma correlação direta entre a carga genética e o risco, mas ao mesmo tempo, mostram que a carga genética isoladamente não determina o desenvolvimento da doença, favorecendo um modelo aditivo de interação de fatores genéticos e ambientais.

Um grande número de genes tem sido estudados e associados à esquizofrenia, entre eles o *DISC1*, relacionado ao metabolismo e arborização neuronal, o *DTNBP1* envolvido na transmissão glutamatérgica, o *NRG1*, relacionado ao desenvolvimento do sistema nervoso central, e o *RGS4* que parece modular a sinalização intracelular [14-16]. Resultados preliminares do nosso grupo revelaram que o gene *DGCR2* está associado à esquizofrenia e que o haplótipo TGG desse gene (rs2073776, rs2072123 e rs807759, respectivamente) parece ser um fator de risco, enquanto que o CAA parece ter um papel protetor para esquizofrenia (Belangero et al., artigo em preparo). Outro trabalho do nosso grupo mostrou que o alelo A do polimorfismo rs5992403 do gene *UFDIL* pode estar envolvido com a idade de acometimento da esquizofrenia [17] e com déficits em funções executivas e memória verbal (Ota et al., submetido – Apêndice III). Além disso, recentemente nosso grupo demonstrou que o alelo G do polimorfismo rs4532 do gene *DRD1* pode contribuir para a refratariedade ao tratamento com antipsicóticos em pacientes com a doença (Ota et al., submetido – Apêndice IV). Para uma revisão completa dos genes já associados à esquizofrenia acesse [www.SZgene.org](http://www.SZgene.org).

### **2.3 Genes que codificam receptores e reguladores de neurotransmissores**

Diversas vias de neurotransmissão estão envolvidas na fisiopatologia da esquizofrenia, para melhor entendimento didático separamos os trabalhos da literatura de acordo com vias específicas, contudo, é importante frisar que cada neurotransmissor não participa de uma única via de neurotransmissão e que o funcionamento dessas vias são interdependentes.

**Via dopaminérgica** - Esta hipótese originou-se de observações que correlacionaram a potência de drogas antipsicóticas com sua afinidade por receptores de dopamina D2 [18] e também de observações que relataram efeitos psicomiméticos de agonistas de dopamina, como a anfetamina [19]. Pacientes com esquizofrenia apresentam maior sensibilidade a efeitos psicóticos de agentes que aumentam a liberação de dopamina [20], assim, genes dopaminérgicos são candidatos para estudos em esquizofrenia [21]. Recentemente foi sugerido que a via dopaminérgica é a via comum final da esquizofrenia, e que os múltiplos fatores ambientais e genéticos, bem como as alterações neuroquímicas e estruturais de regiões específicas do cérebro, interagem e convergem para a hiperdopaminergia estriatal nos pacientes [22].

**Via colinérgica** - Diversos estudos investigaram o gene *CHRNA7* e foram encontradas associações entre polimorfismos desse gene e a doença [23, 24]. Além disso, o *CHRNA7* tem uma expressão diminuída no hipocampo [25] e córtex [26] de pacientes com esquizofrenia. O *CHRNA7* vem despontando como um gene promissor e seus agonistas estão sendo alvos para o desenvolvimento de uma droga capaz de tratar déficits cognitivos da doença [24].

**Via GABAérgica** - A enzima glutamato decarboxylase (GAD) é o fator limitante na síntese do ácido gamma-aminobutírico (GABA), que é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. Estudos de expressão *post-mortem* realizados em cérebros de pacientes com esquizofrenia demonstraram a diminuição da expressão da proteína GAD1 no córtex pré-frontal e cerebelo, [27] sugerindo uma redução da neurotransmissão GABAérgica.

**Via glutamatérgica** - O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso, com uma função crítica na plasticidade sináptica. Agonistas de receptores glutamatérgicos podem causar sintomas psicóticos em indivíduos não afetados, mostrando seu envolvimento na neurobiologia da esquizofrenia [28].

**Via serotoninérgica** - Alterações na função serotoninérgica parecem aumentar a vulnerabilidade a doenças psiquiátricas. O seu envolvimento na patogênese da esquizofrenia foi sugerido quando se observou que o LSD (*lysergic acid diethylamide*), um potente agonista do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2</sub>, tinha propriedades alucinógenas [29]. Drogas antipsicóticas atípicas e antidepressivas possuem alta afinidade por receptores 5-HT<sub>2</sub> [30]. Os receptores serotoninérgicos do tipo 2A (5-HT<sub>2A</sub>) são os mais estudados e estão amplamente presentes no córtex pré-frontal e hipocampo, áreas envolvidas na esquizofrenia [31].

**Neuropeptídeos:** Diversos estudos têm verificado alterações em neuropeptídeos em pacientes com doenças psiquiátricas. Devido à função moduladora de diversos neuropeptídeos sobre a neurotransmissão dopaminérgica esses peptídeos ganharam a atenção para o desenvolvimento de novas drogas antipsicóticas [32, 33]. Na literatura encontramos diversos trabalhos relacionando a esquizofrenia a diferentes neuropeptídeos, como a colecistoquinina, a qual pode controlar a afinidade dos receptores D<sub>2</sub> [33], a ocitocina, que está relacionada com a gravidade dos sintomas em pacientes [34, 35], as taquicininas, que despontam como possíveis alvos terapêuticos [36], e o neuropeptídeo Y, que está menos expresso em esquizoafetivos [37].

**Metabolismo de neurotransmissores** - Um dos principais genes envolvidos no metabolismo de alguns neurotransmissores é o gene *COMT* que codifica a catecolamina-O-metil transferase, que está envolvida na via da degradação de transmissores catecolaminérgicos. Devido ao seu papel funcional e sua localização, polimorfismos do gene *COMT* têm sido bastante estudados em esquizofrenia, principalmente o polimorfismo Val158Met (rs4680) [38].

## 2.4 Tratamento de esquizofrenia

A esquizofrenia é uma doença que requer manutenção do tratamento com antipsicóticos por um longo período na vida do paciente [39]. Em 1952, Delay e Deniker demonstraram que a

clorpromazina era efetiva para o tratamento da esquizofrenia [40]. Atualmente os antipsicóticos são divididos em duas classes: típicos e atípicos. Os antipsicóticos típicos são basicamente antagonistas dos receptores D2/D3 de dopamina, e os antipsicóticos atípicos apresentam um perfil bioquímico mais complexo e possuem afinidade por receptores de diversos neurotransmissores como a serotonina, histamina, acetilcolina entre outros [41]. Acredita-se que tanto a eficácia terapêutica como os sintomas indesejáveis dos antipsicóticos seja resultado da ocupação dos receptores de D2 na região estriatal, sendo a ocupação desejada entre 65% a 80% [42-44].

Uma recente metanálise demonstrou que as duas classes de antipsicóticos são semelhantes em relação à eficácia no controle dos sintomas positivos da esquizofrenia, mas diferem em relação ao perfil de efeitos adversos desencadeados (sintomas extrapiramidais, discinesia tardia, ganho de peso) [45]. Os antipsicóticos atípicos apresentam menor chance de induzir esses sintomas [19], e ainda podem melhorar os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia [46].

Entre os antipsicóticos mais utilizados na clínica estão o haloperidol (típico), risperidona (atípico) e a clozapina (atípico).

- **Haloperidol:** este antipsicótico, assim como todos os típicos, apresenta alta afinidade pelos receptores D2 [41], sendo que pequenas doses podem atingir entre 50 a 90% da ocupação de receptores D2 [47]. Desta forma, esta droga apresenta alto risco para desenvolver sintomas extrapiramidais e discinesia tardia. Porém, como o haloperidol está basicamente restrito ao antagonismo de D2, ele apresenta baixo ganho de peso [48].

- **Risperidona:** esta droga é considerada um antipsicótico atípico por possuir alta afinidade pelos receptores de 5HT2a (antagonismo), porém em altas doses pode atingir uma taxa de ocupação de D2 maior que 80% (semelhante aos antipsicóticos típicos) e apresentar sintomas extrapiramidais [47, 48]. Esta droga costuma ser utilizada em baixas doses para pacientes em primeiro episódio psicótico (PEP) [49].

- **Clozapina:** A clozapina apresenta uma ampla afinidade por receptores de neurotransmissores, agindo como antagonista dos receptores D2, 5-HT<sub>2a</sub>, H1, CHRM<sub>s</sub> entre outros [41]. Mesmo em altas doses a ocupação de D2 desta droga não passa de 70%, sendo portanto a droga mais eficaz e utilizada para pacientes refratários ao tratamento [47]. Contudo, esta droga não é utilizada em larga escala devido ao risco de sintomas adversos como o ganho de peso e efeitos mais graves como a agranulocitose, a qual pode ser fatal [48, 50].

Nos últimos anos foram desenvolvidas novas medicações para o tratamento da esquizofrenia, mas as taxas de recaída psicótica ainda são altas. Essas altas taxas de ineficácia indicam a necessidade de buscar novas abordagens terapêuticas. Desta forma, novos alvos foram hipotetizados, e em 2011 mais de 50 drogas estavam em ensaios clínicos, envolvendo diversas vias de neurotransmissão, como a glutamatérgica, GABAérgica, colinérgica, e até antagonistas de neuropeptídeos como a taquicinina.

## 2.5 Expressão gênica em esquizofrenia

Alguns estudos utilizando *microarrays* em tecidos cerebrais *postmortem* já relataram diferenças de expressão em genes pertencentes a vias de mielinização, GABAérgicas, glutamatérgicas, de sinapse, de mitocôndrias, de resposta imune e de estresse [51]. Entretanto, diversos fatores de confusão podem ter um efeito significativo na expressão gênica em tecido cerebral *postmortem*, mascarando e enviesando esses estudos, tais como a idade, pH, gênero, qualidade do mRNA [51] e tempo de tratamento com antipsicóticos [52]. Esses fatores somados à indisponibilidade do tecido cerebral levaram à busca de perfis de expressão em tecidos periféricos, como o sangue [53, 54]. Além disso, a possibilidade de observar o efeito da progressão e estado da doença e da medicação só é possível com esse tipo de abordagem.

Assim, alguns estudos observaram alterações de expressão em sangue periférico de genes relacionados com a esquizofrenia, como o *DRD2* [55], *NRG1* [56], *CHRNA7* [57] e *SELENBP1* [58]. Contudo, apenas dois estudos investigaram expressão gênica em sangue total de pacientes virgens de tratamento e em PEP [54, 56], relatando diferenças em genes envolvidos na transcrição e processamento de RNA, ubiquitina, metabolismo de lipídio / glicose / proteína, transdução de sinal, citoesqueleto e fatores de crescimento [54, 56]. Alguns trabalhos mostraram que os genes *NRG1* e *DAAM2* poderiam ser potenciais marcadores de progressão e/ou resposta ao tratamento, uma vez que os níveis de expressão retornaram ao normal após a remissão [54, 56].

Existem poucos estudos bem conduzidos que investigaram alterações de expressão, buscando biomarcadores e visando à individualização de esquemas terapêuticos [59, 60]. Apesar dos progressos no tratamento, as medicações disponíveis atualmente continuam sendo bastante limitadas na sua eficácia clínica e poucos indivíduos voltam a ter o funcionamento compatível com as expectativas pré-morbidas [61].

## **2.6 Modelos animais de esquizofrenia**

O desenvolvimento de modelos animais para o estudo da esquizofrenia enfrenta uma grande barreira, a dificuldade em se traduzir a sintomatologia da doença no comportamento animal, como por exemplo as alucinações e delírios. Contudo, a dificuldade em se estudar a fisiologia e biologia molecular do cérebro do paciente, dificulta o avanço no entendimento da fisiopatologia e sintomatologia da esquizofrenia. O estudo em modelo animal, por outro lado, permite a investigação das alterações comportamentais, diretamente no seu tecido alvo da doença.

Willner et al. (1984, 1986), propuseram que para validar um modelo animal confiável



para determinada doença, este modelo teria de compreender três tipos de validadores: validade de face (*face validity*), validade de predição farmacológica (*predictive validity*), e validade de construto (*construct validity*) [62, 63]. A validade de face propõe que o modelo apresente características comportamentais, anatômicas ou bioquímicas semelhante a doença em humanos. Na predição farmacológica, a resposta do animal a determinada droga deve ser semelhante ao encontrado nos pacientes, seja esse efeito benéfico ou não. A validação de construto pode ser acessada de diversas maneiras, de tal forma que os animais apresentem um processo etiológico comum, como um fator de risco semelhante ao encontrado para a doença em estudo.

A princípio, a manipulação genética de animais permite a ativação ou inativação de genes específicos ligados à determinada doença. Em esquizofrenia, diversos modelos animais foram gerados a partir dessas técnicas: camundongos *knockdown* para o *DISC1* [64], camundongo *knockout* para o *NRG-1* [65] e camundongo *knockout* para o *BDNF* [66]. Porém, como dito anteriormente, a esquizofrenia abrange uma fisiopatologia complexa, onde diversos fatores genéticos e ambientais, isoladamente, apresentam pequeno efeito, que somados levam ao distúrbio. Assim, o estudo em camundongos *knockout* ou *knockdown* é importante para entender o efeito de um único gene, mas não mimetizam as diversas alterações encontradas no cérebro de um paciente com esquizofrenia.

A linhagem de ratos SHR (*spontaneously hypertensive rats*), uma linhagem *inbred*, foi primariamente originada a partir do Wistar Kyoto para o estudo da hipertensão, contudo, recentemente foi verificado pelo nosso grupo que esta linhagem apresenta déficits na tarefa de medo condicionado ao contexto que são especificamente atenuados pela administração de antipsicóticos e agravados por manipulações “pró-esquizofrênicas”, como o isolamento social. Esses resultados levaram a sugerir que o déficit de medo condicionado ao contexto apresentado pela linhagem SHR pudesse ser utilizado para o estudo de prejuízos de entendimento de contextos emocionais associados à esquizofrenia [25]. Da mesma forma,

essa linhagem também apresenta: 1) déficits de interação social (um modelo para o estudo dos sintomas negativos da esquizofrenia) [26] que, à semelhança em humanos, são atenuados somente por antipsicóticos atípicos [25], 2) déficits de inibição pré-pulso (um modelo para o estudo de prejuízos no filtro sensorio-motor associado à esquizofrenia) [27] que também são atenuados por antipsicóticos [67].

Além disso, enquanto que pacientes portadores de esquizofrenia apresentam uma incidência aumentada de abuso de drogas psicoestimulantes [28], a administração repetida de anfetamina e metilfenidato promove uma maior sensibilização comportamental em ratos SHR [25]. Por fim, enquanto a prevalência de discinesia tardia - um efeito colateral motor do tratamento prolongado com antipsicóticos [29] - em pacientes portadores de esquizofrenia é menor quando comparada a pacientes portadores de outros transtornos tratados com antipsicóticos [30], animais SHR não desenvolvem discinesia orofacial em modelos de discinesia tardia [31]. Tomados em conjunto, esses dados evidenciam intersecções entre a esquizofrenia e a linhagem SHR, tanto no perfil comportamental (validação de face), quanto na resposta a drogas (validação de predição farmacológica). Uma vantagem desse modelo é a ausência de manipulação genética, já que esses animais apresentam alterações comportamentais e reversão com tratamento farmacológico de forma espontânea e não induzida.

Dessa maneira, é de suma importância a avaliação da expressão de genes relacionados à fisiopatologia/etiologia da esquizofrenia, bem como a investigação dos efeitos dos antipsicóticos em animais SHR, a fim de realizar um dos passos da validação de construto para esse modelo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais:

- 1) Investigar se há diferença na expressão de genes de receptores e reguladores de neurotransmissores no córtex pré-frontal (CPF), no *nucleus accumbens* (NAcc) e no sangue periférico (SP) entre as linhagens Wistar e SHR e entre animais SHR tratados e não tratados com antipsicótico.
- 2) Verificar a rede de interação entre os genes diferencialmente expressos.
- 3) Verificar se existe correlação entre sangue e cérebro de(os):
  - a) genes diferencialmente expressos no CPF e NAcc do SHR, com o intuito de buscar potenciais biomarcadores para a doença/alteração de comportamento e para o tratamento;
  - b) todos os 84 genes estudados, independentemente da linhagem ou do tratamento, visando conhecer quais genes apresentam uma correlação entre esses tecidos, a fim de fornecer dados para nosso estudo paralelo com humanos e também para outros estudos.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- 1a) Verificar a expressão de 84 genes relacionados à neurotransmissão no CPF, NAcc e SP entre:
  - as linhagens Wistar e SHR tratados com veículo;
  - os animais SHR tratados com veículo e SHR tratados com risperidona.
- 1b) Verificar a expressão de 84 genes relacionados à neurotransmissão no CPF e NAcc entre:
  - os animais SHR tratados com veículo e SHR tratados com clozapina;
  - os animais SHR tratados com veículo e SHR tratados com haloperidol.
- 2a) Encontrar vias relacionadas com a condição do SHR.
- 2b) Encontrar genes-alvo para os próximos estudos de expressão na linhagem SHR.

3) Verificar a correlação da expressão gênica entre SP e regiões cerebrais (CPF ou NAcc):

- na linhagem SHR para os genes diferencialmente expressos;
- nos três grupos em que analisamos a expressão do sangue (Wistar e SHR tratados com veículo e SHR tratado com risperidona) para os 84 genes estudados.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Preparação dos animais**

Para este projeto utilizamos 60 ratos machos e adultos (5 meses), sendo 30 ratos da linhagem Wistar (controle) (Wistar) e 30 ratos da linhagem SHR, separados em caixas de 5 animais. Nós dividimos cada linhagem em quatro grupos de tratamento:

- veículo (N=8);
- risperidona (antipsicótico atípico) (N=8);
- clozapina (antipsicótico atípico) (N=7);
- haloperidol (antipsicótico típico) (N=7)

Um dia antes do início do tratamento os animais foram pesados e marcados de acordo com a droga recebida, essa escolha foi aleatória e em cada caixa havia pelo menos um animal de cada grupo de tratamento (caixas heterogêneas). Para esse estudo verificamos a expressão do grupo Wistar tratado com veículo e todos os quatro grupos da linhagem SHR. O material dos grupos Wistar tratados com antipsicóticos foi devidamente coletado e extraído, porém serão utilizados em trabalhos posteriores sem a necessidade de repetir os grupos analisados neste projeto.

### **4.2 Tratamento**

Para o tratamento dos animais, utilizamos três antipsicóticos amplamente utilizados na clínica para pacientes com esquizofrenia. Dentre eles dois antipsicóticos atípicos, risperidona (0,5 mg/Kg,) e clozapina (2,5mg/Kg) e um antipsicótico típico, haloperidol (0,5 mg/Kg). As

quantidades de antipsicótico utilizadas foram baseadas nos trabalhos anteriores do nosso grupo [67-69].

Os animais foram tratados durante 30 dias consecutivos e a administração das drogas foi realizada todos os dias no mesmo horário (12h00 - 14h00). Toda semana os animais eram marcados e pesados novamente para que a razão peso/droga se mantivesse a mesma. Durante o tratamento apenas um animal morreu, o qual pertencia ao grupo haloperidol da linhagem SHR e apresentava desde o início peso inferior aos outros animais.

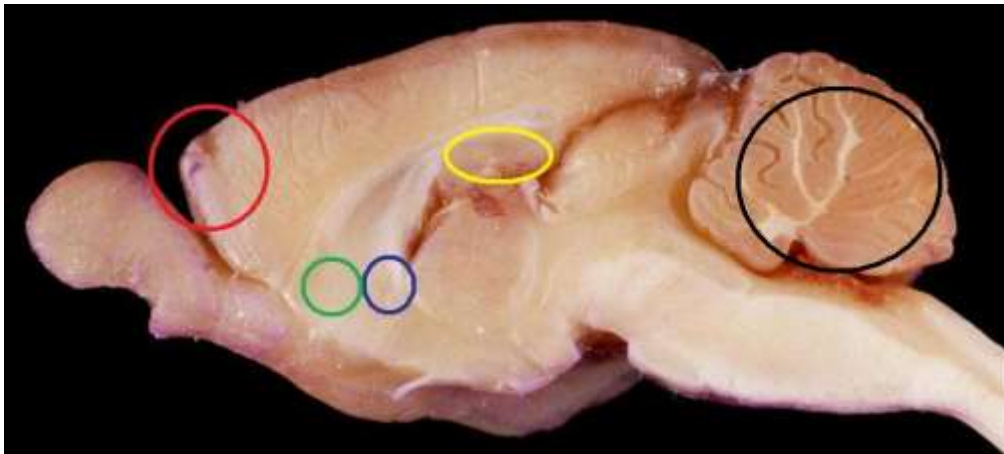
### **4.3 Coleta do material biológico e eutanásia**

Um dia antes do início do tratamento, realizamos a retirada de 400µL de sangue através de punção caudal (seringas com agulhas de 21 Gauges (G) sem anticoagulante). Os animais foram brevemente sedados com éter e o sangue coletado foi transferido para tubos contendo a solução *Paxgene* (Qiagen®, Maryland, EUA), solução estabilizadora de RNA, na proporção correta para ratos (275µL de solução para cada 100µL de sangue) [70].

No último dia de tratamento, os animais receberam a droga 30 minutos antes da coleta do material. Os animais foram, então, anestesiados com Xilasina/Quetamina (i.p., 100 e 50 mg/Kg, respectivamente) e três minutos depois foi verificado se o mesmo estava totalmente sedado.

Com o animal anestesiado, o primeiro procedimento foi a punção cardíaca, na qual coletamos 2,5 mL de sangue em um tubo *Paxgene* e 3 mL em tubo contendo EDTA utilizando escalpes de 23G. O uso de escalpes para coleta de sangue em rato, embora incomum, garante a menor interferência possível no RNA. Os tubos *Paxgene* foram armazenados em freezer -20°C e os tubos contendo EDTA foram mantidos em geladeira.

Imediatamente, o animal foi sacrificado na guilhotina e procedeu-se a dissecação de cinco regiões (Fig.1): córtex pré-frontal (CPF), *nucleus accumbens* (NAcc), estriado dorsal, hipocampo e cerebelo. Para a dissecação correta das regiões nos baseamos em um atlas estereotático de rato [71]. Com relação ao hipocampo, coletamos toda a região hipocampal sem diferenciá-lo em ventral e dorsal. Todas essas cinco regiões foram divididas em dois tubos cada (direita e esquerda), um com solução estabilizadora de RNA para tecidos (*RNAlater*, Qiagen®) e outro para a extração de DNA. Ambos foram imediatamente colocados em freezer -20°C, e no dia seguinte armazenados em freezer -80°C.



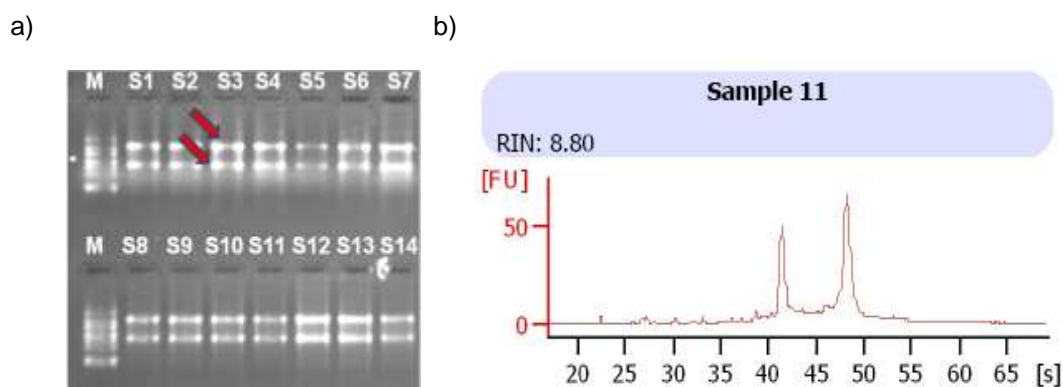
**Figura 1.** Cérebro de rato, em destaque as regiões que foram dissecadas em nosso estudo: córtex pré-frontal (em vermelho), *nucleus accumbens* (em verde), estriado dorsal (em azul), hipocampo (em amarelo) e cerebelo (em preto).

#### 4.4 Extração de RNA

Primeiramente, realizamos a extração de RNA do sangue de todos os tubos coletados nas punções cardíaca (59) e caudal (60) utilizando o kit de coluna *Paxgene Blood Kit* (Qiagen®). Nós extraímos apenas o CPF e NAcc das regiões cerebrais coletadas, as demais foram mantidas no freezer -80°C. Essa extração de RNA de tecido foi dividida em duas etapas, primeiro a homogeneização do tecido em Trizol (Qiagen®) utilizando o *TissueRuptor* (Qiagen®) para lise celular mecânica e em seguida, a extração do RNA, propriamente dita, com o kit de coluna

*RNeasy Mini Kit* (Qiagen®). Todas as etapas de extração de RNA foram realizadas em local apropriado para evitar contaminação com DNA e todos materiais utilizados foram previamente submetidos a limpeza por RNaseZAP (Abion®).

Tanto o RNA do tecido cerebral como do sangue foram quantificados pelo NanoDrop (Thermo Scientific®, Wilmington, EUA) e separada uma pequena alíquota para verificação da integridade do RNA por meio de gel de agarose a 1% ou do Bioanalyser (Agilent®, Santa Clara, EUA) (Figura 2a e 2b respectivamente). A quantificação pelo NanoDrop (Thermo Scientific®) permite também a verificação das razões 260/230 e 260/280, as quais avaliam a qualidade do RNA quanto à contaminação de compostos químicos e de proteína, respectivamente, após a extração. As amostras que apresentaram valores abaixo do esperado para a razão 260/230 (<1.5) foram submetidas a um protocolo de limpeza, o “*CleanUp*”, sugerido pelo fabricante.



**Figura 2.** a) Gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA. As setas apontam as duas bandas esperadas: a fração 18S (2kb) e a fração 28S (5kb). O marcador utilizado (1ª coluna à esquerda) foi o *RiboRuler High Range RNA Lader*. b) Picos gerados pelo aparelho Bioanalyser (Agilent®) referentes às frações 18S e 28S. O escore de RIN foi 8,80 (ideal entre 7-10).

#### 4.5 Extração de DNA

Os tubos de sangue coletados para extração de DNA serão utilizados em uma segunda etapa do projeto “*Investigação de marcadores genéticos e epigenéticos: uma abordagem translacional para o tratamento de esquizofrenia*” (FAPESP 2010/08968-6), na qual iremos



avaliar o padrão de metilação dos genes diferencialmente expressos encontrados neste estudo. Desta forma, as extrações de DNA do sangue e das regiões cerebrais já foram realizadas utilizando os kits *Gentra puregene Blood* e *Qiaamp DNA tissue*, respectivamente, e em breve o padrão de metilação dos genes selecionados será analisado.

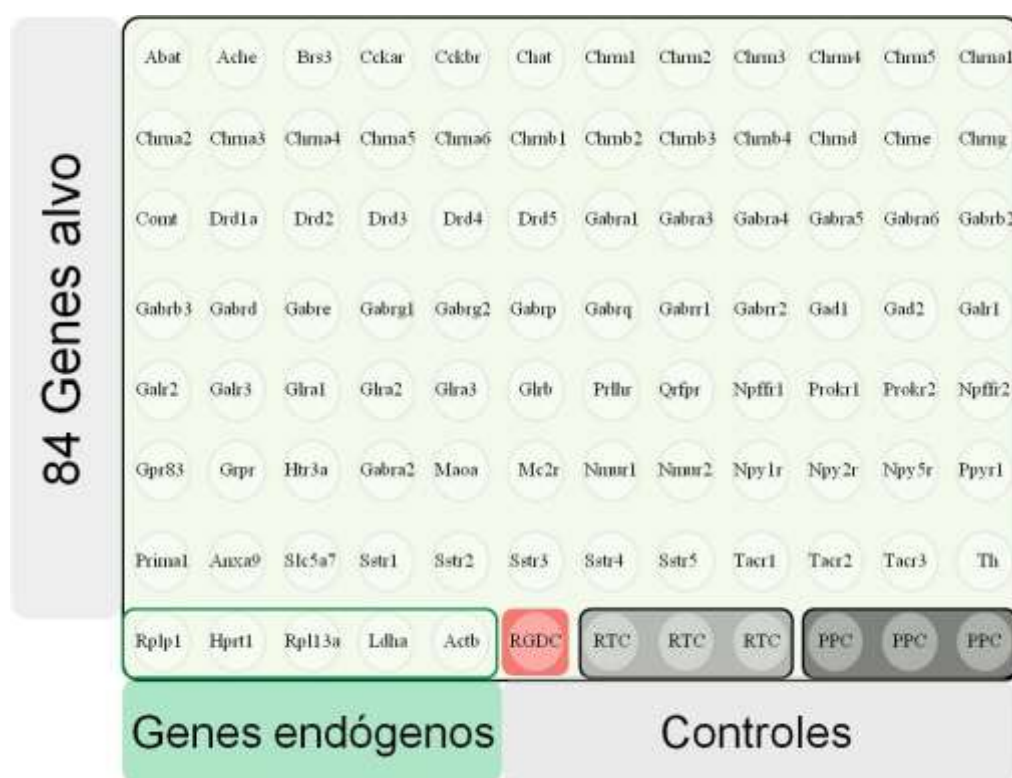
#### **4.6 PCRarray**

Para a análise do perfil de expressão gênica, foi utilizada a tecnologia de *Superarray – RT2 Profiler™ PCRarray System* (Qiagen®) utilizando o *Neurotransmitter Receptors and Regulators PCRarray* específico para ratos (PARN – 060).

Esta metodologia baseia-se no uso da RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) em tempo real para detecção e quantificação simultânea da expressão de 84 genes de receptores e reguladores de neurotransmissores (Tabela 1). Além dos 84 genes de interesse, essa placa conta também com cinco genes endógenos, necessários para normalização dos dados pelo método de Ct (*threshold cycle*) comparativo, e controles da reação que avaliam a presença de DNA genômico contaminante, a qualidade do RNA utilizado e a eficiência da reação (Figura 3).

---

Vias	Genes
Receptores de acetilcolina	<i>Chrm3, LOC689830 (Anxa9)</i>
Receptores muscarínicos de acetilcolina	<i>Chrm1, Chrm2, Chrm3, Chrm4, Chrm5</i>
Receptores adrenocorticotrópicos	<i>Mc2r</i>
Receptores de bombesina	<i>Brs3, Grpr</i>
Receptores de colecistocinina	<i>Cckar, Cckbr</i>
Receptores de dopamina	<i>Drd1a, Drd2, Drd3, Drd4, Drd5</i>
Receptores de GABA-A	<i>Gabra1, Gabra3, Gabra4, Gabra5, Gabra6, Gabrb2, Gabrb3, Gabrd, Gabre, Gabrg1, Gabrg2, Gabrp, Gabrq, Gabrr1, Gabrr2, Glra1, Glra2, Glra3, Glra4, LOC289606 (Gabra2)</i>
Receptores de gastrina	<i>Cckar, Cckbr, Galr1, Galr2, Galr3</i>
Receptores de neuromedina U	<i>Nmur1, Nmur2</i>
Receptores de neuropeptídeo	<i>Npffr1 (Gpr147), Npffr2 (Gpr74)</i>
Receptores de neuropeptídeo Y	<i>Prllhr (Gpr10), Gpr103, Prokr1 (Gpr73), Prokr2 (Gpr73l1), Gpr83, Npy1r, Npy2r, Npy5r, Ppyr1</i>
Receptores de peptídeo YY	<i>Npy1r, Npy2r, Npy5r, Ppyr1</i>
Receptores de serotonina	<i>Htr3a</i>
Receptores de somatostatina	<i>Sstr1, Sstr2, Sstr3, Sstr4, Sstr5</i>
Receptores de taquicinina	<i>Tacr1, Tacr2, Tacr3</i>
Receptores de outros NTs	<i>Chrna1, Chrna2, Chrna3, Chrna4, Chrna5, Chrna6, Chrnb1, Chrnb2, Chrnb3, Chrnb4, Chrnd, Chrne, Chrng, Glrb</i>
<b>Regulação de níveis de Neurotransmissores</b>	
Biossíntese de neurotransmissores	<i>Chat, Gad1, Gad2, Slc5a7, Th</i>
Catabolismo de neurotransmissores	<i>Abat, Ache, Comt, Maa, Prma1</i>
<b>Genes endógenos</b>	<i>Actb, Rplp1, Hp1r1, Rpl13a, Ldha</i>



**Figura 3. Esquema da placa de PCRarray utilizada.** As sete primeiras linhas contêm os 84 genes de interesse. A última linha contém cinco genes endógenos e sete poços de controles da reação: RGDC-controle da presença de DNA genômico de rato, RTC-controle da reação de transcrição reversa e PPC-controle da reação de PCR em tempo real.

Para a realização do experimento, após a extração, o RNA foi convertido a cDNA utilizando-se do kit *RT2 First Strand* (Qiagen®) e em seguida, foi realizada uma PCR com a placa mencionada acima, utilizando o aparelho 7500 Fast PCR Real-Time System (*Applied Biosystems*®, EUA). A detecção da expressão gênica é realizada com o uso do corante SYBR® Green (Qiagen®), capaz de intercalar-se em moléculas de DNA dupla fita e de emitir fluorescência proporcional à quantidade de DNA amplificado durante a PCR. A quantificação foi obtida a partir do cálculo do  $\Delta C_t$ , baseando-se nos valores de  $C_t$  de cada um dos genes estudados e dos controles endógenos. A expressão relativa de cada gene entre os grupos a serem estudados é calculado pelo método de  $C_t$  comparativo ( $\Delta\Delta C_t$ ).

Nós verificamos a expressão gênica no CPF e NAcc para os grupos: Wistar - veículo, SHR - veículo, SHR – risperidona, SHR – clozapina, e SHR – haloperidol. Com relação ao

sangue, verificamos a expressão apenas nos grupos Wistar e SHR tratados com veículo e no grupo SHR tratado com risperidona, pois esse antipsicótico foi o escolhido no protocolo de pesquisa realizado nos pacientes (projeto paralelo com humanos estudando indivíduos controles, pacientes em primeiro episódio psicótico virgens de tratamento e pacientes tratados durante um mês com risperidona). O RNA proveniente das amostras dos outros grupos de tratamento (Wistar-Risperidona; Wistar-Clozapina; Wistar-Haloperidol) está armazenado em freezer -80°C e será utilizado em trabalhos posteriores.

#### **4.7 Inclusão/exclusão de genes alvo e endógenos para o estudo da expressão gênica**

Alguns genes de neurotransmissores não se expressam em um determinado tecido ou região cerebral. Desta forma, utilizamos o programa de análise oferecido pela SABioscience (Web-Based PCRarray Data Analysis), no qual classifica os genes com escores de acordo com seu Ct e sua significância ( $p < 0.05$ ), para excluir os genes que não se expressaram ( $Ct > 35$ ; escore C) ou os genes que possuíam baixa expressão e baixa significância (30-35 Cts; escore B) nos dois grupos em comparação (Wistar x SHR ou SHRveículo x SHRtratado com antipsicótico).

Desta forma, para a comparação entre os grupos Wistar e SHR, foram estudados 60 genes no CPF, 55 genes no NAcc e 11 genes no SP (Tabela 2). Já para a comparação entre os grupos SHR não tratado e SHR tratado com antipsicótico foram estudados 72 genes no CPF, 64 genes no NAcc e 7 genes no SP (apenas SHR tratado com risperidona) (Tabela 3).

**Tabela 2.** Genes estudados em cada tecido para a comparação Wistar x SHR ambos tratados com veículo.

<b>Tecido</b>	<b>Genes estudados na comparação Wistar x SHR</b>
<b>Córtex pré-frontal</b>	<i>Gabra6, Chrbn1, Chrna2, Gabrr2, Chrm4, Chrm2, Chrng, Sstr2, Glrb, Gabra5, Chrm1, Gabra2, Abat, Gabrq, Ache, Tacr1, Gabrg1, Htr3a, Chrna3, Sstr3, Gabra4, Chrbn3, Chrna5, Galr2, Chrna4, Cckbr, Chrne, Gabra3, Npy5r, Chrbn2, Comt, Sstr1, Gad1, Prlhr, Drd1a, Gabrd, Anxa9, Sstr4, Drd2, Th, Glra3, Gabrb2, Prima1, Gabrb3, Npy1r, Gabra1, Glra2, Grpr, Chrm3, Gpr83, Glra1, Chat, Gabrg2, Maoa, Tacr3, Prokr2, Gad2, Chrbn4, Qrfpr, Slc5a7</i>
<b>Nucleus accumbens</b>	<i>Glra2, Cckbr, Gabra1, Chrm3, Ache, Sstr2, Chrbn1, Qrfpr, Gabrb2, Gabra5, Comt, Chrbn2, Gad1, Drd3, Sstr1, Gpr83, Prima1, Gabrb3, Maoa, Glra3, Npy1r, Drd2, Chrna4, Prokr2, Slc5a7, Glrb, Chat, Tacr1, Chrna3, Gabra3, Gabra4, Gad2, Sstr4, Abat, Chrm2, Chrna6, Chrm4, Gabrd, Chrm1, Drd1a, Htr3a, Gabrg1, Gabrg2, Chrna2, Chrng, Chrna5, Chrne, Npy5r, Chrm5, Tacr3, Gabra2, Nmur2, Prlhr, Gabrr2, Anxa9</i>
<b>Sangue Periférico</b>	<i>Chrne, Qrfpr, Ache, Chrng, Comt, Gabrr2, Gabra1, Drd1a, Sstr3, Maoa, Sstr4</i>

**Tabela 3.** Genes estudados em cada tecido para a comparação entre o grupo SHR tratado com veículo e os grupos SHR tratados com antipsicótico.

<b>Tecido</b>	<b>Genes estudados na comparação SHR veículo x SHR tratado</b>
<b>Córtex Pré-frontal</b>	<i>Abat, Mc2r, Npy5r, Ppyr1, Nmur2, Chrna6, Prima1, Chrm4, Chrna3, Chrm1, Gabra4, Nmur1, Gabrb2, Gabrb3, Chrnd, Glrb, Gabra2, Galr3, Gabra6, Prlhr, Gabrg2, Brs3, Gpr83, Npy1r, Chrng, Drd3, Chrm3, Gabrd, Comt, Gabrr1, Gad2, Tacr1, Drd5, Qrfpr, Htr3a, Glra3, Grpr, Ache, Cckbr, Gabra1, Gabrg1, Chrbn3, Sstr3, Maoa, Galr1, Gad1, Chrna4, Gabrq, Anxa9, Chrna2, Cckar, Chrne, Chrm5, Gabrr2, Npffr2, Gabra3, Slc5a7, Chrbn2, Gabra5, Sstr1, Prokr2, Sstr4, Chrbn1, Tacr3, Glra2, Chrm2, Drd2, Chrna5, Th, Sstr2, Drd1a, Glra1</i>
<b>Nucleus accumbens</b>	<i>Abat, Drd3, Drd1a, Drd2, Prokr2, Chrna3, Slc5a7, Gabrb3, Tacr1, Th, Htr3a, Gad1, Gad2, Gabrg2, Prlhr, Glra3, Gpr83, Npy5r, Sstr2, Gabra4, Gabrd, Ache, Chrm4, Tacr3, Chat, Sstr3, Sstr1, Chrna2, Chrna4, Npy1r, Gabrg1, Comt, Chrna5, Qrfpr, Gabrq, Gabra2, Gabra1, Chrm5, Gabra3, Gabrb2, Cckbr, Brs3, Chrne, Drd5, Chrm3, Sstr4, Gabra5, Glrb, Chrbn1, Maoa, Mc2r, Ppyr1, Glra2, Chrm2, Chrbn2, Cckar, Galr3, Sstr5, Chrm1, Gabra6, Prima1, Anxa9, Gabrr1, Chrng</i>
<b>Sangue Periférico</b>	<i>Chrne, Qrfpr, Ache, Chrng, Comt, Gabrr2, Gabra1, Drd1a, Sstr3, Maoa, Sstr4</i>

Os genes endógenos são genes constitutivos necessários para a manutenção de toda e qualquer célula e, por isso, são expressos em qualquer tecido e em qualquer etapa do desenvolvimento [72]. Para o nosso trabalho, excluímos da análise os genes endógenos que apresentaram uma variação média maior do que 1 (um) Ct entre os grupos estudados. A inclusão/exclusão de genes endógenos também foi realizada em cada um dos tecidos estudados. Nas regiões cerebrais, CPF e NAcc, apenas o gene *Rpl13a* precisou ser excluído, porém no sangue excluímos três genes, *Rplp1*, *Hprt1*, *Rpl13a*.

## 4.8 Análise estatística

### 4.8.1 Expressão gênica

Utilizamos um *threshold* comum para os 84 genes alvos e cinco genes endógenos, obtendo desta forma o Ct de cada amostra (conforme sugerido pelo protocolo do fabricante). Todos os valores de Ct dos genes alvos foram normalizados pelos valores da média dos Cts dos genes endógenos, obtendo-se, assim, o valor de  $\Delta Ct$  para cada amostra. A partir daí foi possível calcular o valor de  $2^{-\Delta Ct}$ , variável quantitativa utilizada nas análises estatísticas propriamente ditas, que foram realizadas no programa SPSS (PASW Statistics 18).

A normalidade da variável e a homogeneidade dos grupos foram verificadas por meio dos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Em alguns genes, essa variável não apresentava uma distribuição normal e assim, optamos por padronizá-la aplicando Z-Escore para todas as variáveis e excluindo as amostras *outliers* com valores maiores ou menores que |3|.

A partir dessa padronização aplicamos uma análise paramétrica, o Teste *t* de Student, e adotamos um índice de significância de  $\alpha < 0,05$ . Com o intuito de evitar resultados falso-positivos, realizamos o teste *False Discovering Rate* (FDR) (Benjamini & Hochberg), uma correção para múltiplas comparações. Este teste baseia-se em duas etapas, na primeira os valores de p encontrados

no Teste *t* de Student são dispostos em um ranking decrescente e em seguida são corrigidos de acordo com o número de comparações e a posição do gene no ranking, como mostra a fórmula abaixo:

$$\frac{N}{[N - (R_k - 1)]} \times (\text{valor de } p) = p\text{-corrigido}$$

onde *N* é o número de genes na comparação, *R<sub>k</sub>* é a posição de cada gene no ranking, sendo que *R<sub>k</sub>* vai de 1 até *N* (o maior valor de *p* ocupa a primeira colocação no ranking, o segundo maior, a segunda posição e assim por diante, de tal forma que o menor valor de *p* será corrigido por (*N* x valor de *p*)).

Assim, os primeiros genes do ranking (maiores valores de *p*) recebem pouca correção e os últimos sofrem mais correção. O índice de significância adotado após a correção foi de  $\alpha < 0,05$  e nós não utilizamos um valor de fold *regulation* de corte.

#### 4.8.2 Interação das regiões cerebrais e linhagem

Nós selecionamos os genes diferencialmente expressos no teste-T (sem a correção FDR) e realizamos uma Análise de Variância de duas vias a fim de verificar se algum desses genes estavam diferencialmente expressos entre as duas regiões cerebrais (CPF e NAcc) e entre as linhagens (SHR e Wistar). Em outras palavras, se algum desses genes estava hiperexpresso em uma região e hipoexpresso em outra, ou vice e versa, nos animais SHR comparados aos animais Wistar.

#### 4.8.3 Rede de interação dos genes diferencialmente expressos

O MetaCore™ é um software com base de dados integrada para analisar as possíveis vias de relação com dados biológicos experimentais. Esse programa gera uma conexão do seu

dados (genes ou proteínas, tecido alvo, doença de estudo, etc) com trabalhos da literatura. Diferentemente de outros softwares, o MetaCore™ é curado manualmente, permitindo maior confiabilidade nas conexões geradas. Em nosso trabalho, selecionamos os genes diferencialmente expressos no mesmo tecido e verificamos a integração entre eles através da opção “shortest path”, ou seja, o caminho mais curto de conexão entre os dois genes. Essa abordagem permite visualizar nossos resultados de forma mais abrangente e sugerir vias possivelmente alteradas.

#### **4.8.4 Correlação sangue e cérebro**

Selecionamos os genes diferencialmente expressos no CPF e no NAcc, separadamente, entre SHR e Wistar para verificarmos uma possível correlação entre o sangue e o cérebro no modelo SHR. Além dessa abordagem, verificamos, para todos os 84 genes, se algum gene estava correlacionado com o sangue e cérebro para todos os três grupos de tratamento (SHR e Wistar tratados com veículo e SHR tratado com risperidona). Adotamos um índice de significância de  $\alpha < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS

No total, realizamos 96 placas de PCRarray, sendo 36 para o CPF e 36 para o NAcc (8 Wistar-Veículo, 8 SHR-Veículo, 8 SHR-risperidona, 6 SHR-Clozapina, 6 SHR-Haloperidol), e 24 para o sangue (8 Wistar-Veículo, 8 SHR-Veículo, 8 SHR-risperidona). Isso nos proporcionou duas comparações, a primeira entre as linhagens Wistar e SHR, e a segunda entre os diferentes tratamentos da linhagem SHR. Dessas 96 placas, quatro foram excluídas da análise (duas do CPF e duas do SP) pois não atenderam aos parâmetros estabelecidos mencionados anteriormente.

### 5.1 Pesagem dos animais ao longo do tratamento

Todos os animais foram pesados semanalmente, e ao fim do tratamento todos os grupos apresentaram ganho de peso significativo ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença de peso estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento da linhagem SHR. A linhagem Wistar é naturalmente mais pesada que o SHR, porém o ganho de peso durante o tratamento entre as linhagens foi semelhante (Tabela 4).

**Tabela 4. Peso dos animais durante o tratamento.**

Grupo	N	Início	1ªsemana	2ªsemana	3ªsemana	4ªsemana/Final
Wistar veículo	8	423,75	426,88	425,63	439,38	445,00
SHR veículo	8	320,63	326,25	331,88	333,75	341,88
SHR risperidona	8	320,00	318,13	318,75	318,75	324,38
SHR clozapina	7	307,14	307,86	311,43	314,29	322,86
SHR haloperidol	6	321,67	325,00	316,67	320,83	331,67

### 5.2 SHR x Wistar tratados com veículo

Na comparação Wistar x SHR ambos tratados com veículo encontramos oito genes diferencialmente expressos no CPF (*Chrn4*, *Slc5a7*, *Gad2*, *Qrfpr*, *Maoa*, *Tacr3*, *Gabrg2* e *Prok2*), cinco no NAcc (*Gabra2*, *Gabbr2*, *Prhr*, *Nmur2* e *Anxa9*) e dois no sangue periférico

(*Maoa* e *Sstr4*). Após o teste de correção FDR para múltiplas comparações restaram cinco genes significantes, quatro no CPF (*Chrn4*, *Slc5a7*, *Gad2* e *Qrfpr*) e um no sangue (*Sstr4*). As Tabelas 5, 6 e 7 mostram os resultados para cada tecido, CPF, NAcc e SP. Os valores de Fold Regulation (FR) se referem quantas vezes o gene está hipo ou hiperexpresso no SHR em relação ao Wistar (controle).

**Tabela 5.** Resultados da expressão gênica no **córtex pré-frontal** entre as linhagens SHR e Wistar tratados com **veículo**.

Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	Fold Regulation
	t	g	p	p-corrigido	
<i>Abat</i>	0,503	12	0,624	0,780	-1,02
<i>Ache</i>	-0,560	12	0,586	0,764	-1,09
<i>Cckbr</i>	-0,979	12	0,347	0,594	-1,09
* <i>Chat</i>	-2,394	12	0,034	0,226	-1,27
<i>Chrm1</i>	-0,422	12	0,680	0,817	-1,07
<i>Chrm2</i>	-0,312	12	0,760	0,829	-1,02
<i>Chrm3</i>	-1,940	12	0,076	0,381	-1,24
<i>Chrm4</i>	-0,295	12	0,773	0,828	-1,25
<i>Chrna2</i>	0,192	12	0,851	0,881	-1,07
<i>Chrna3</i>	-0,720	12	0,486	0,694	-1,07
<i>Chrna4</i>	-0,917	12	0,377	0,629	-1,07
<i>Chrna5</i>	0,905	12	0,383	0,605	1,34
<i>Chrn1</i>	-0,120	12	0,907	0,922	1,04
<i>Chrn2</i>	-1,132	12	0,280	0,542	-1,14
<i>Chrn3</i>	0,845	12	0,415	0,638	1,35
** <i>Chrn4</i>	-3,985	12	0,002	0,036	-1,83
<i>Chrne</i>	-1,069	8,542	0,314	0,540	-1,12
<i>Chrng</i>	-0,314	12	0,759	0,843	-2,18
<i>Comt</i>	-1,181	11	0,262	0,525	1,00
<i>Drd1a</i>	-1,302	12	0,217	0,501	-1,16
<i>Drd2</i>	1,416	12	0,182	0,497	1,24
<i>Gabra1</i>	-1,765	12	0,103	0,412	-1,13
<i>Gabra3</i>	-1,101	12	0,292	0,531	-1,07
<i>Gabra4</i>	-0,840	12	0,418	0,626	-1,04
<i>Gabra5</i>	0,418	12	0,683	0,804	1,05
<i>Gabra6</i>	-0,094	12	0,927	0,927	1,00
<i>Gabrb2</i>	-1,651	12	0,125	0,393	-1,11
<i>Gabrb3</i>	-1,679	12	0,119	0,420	-1,05

Continua

<i>Gabrd</i>	-1,348	12	0,202	0,486	-1,12
<i>Gabrg1</i>	-0,665	12	0,519	0,707	-1,01
<i>*Gabrg2</i>	-2,533	12	0,026	0,197	-1,15
<i>Gabrq</i>	-0,514	12	0,617	0,787	-1,14
<i>Gabrr2</i>	-0,234	9,664	0,820	0,862	1,09
<i>Gad1</i>	-1,259	12	0,232	0,497	-1,07
<i>**Gad2</i>	-3,702	12	0,003	0,045	-1,32
<i>Galr2</i>	-0,906	12	0,383	0,621	-1,84
<i>Gla1</i>	-2,228	6,929	0,062	0,275	-1,44
<i>Gla2</i>	-1,768	12	0,102	0,439	-1,10
<i>Gla3</i>	-1,570	12	0,142	0,427	-1,04
<i>Glr1b</i>	-0,354	12	0,729	0,841	1,02
<i>Prlhr</i>	-1,267	12	0,229	0,509	-1,09
<i>**Qrfpr</i>	-4,428	12	0,001	0,025	-5,29
<i>Prokr2</i>	-2,825	12	0,015	0,184	-1,22
<i>Gpr83</i>	-2,013	12	0,067	0,366	-1,24
<i>Grpr</i>	-1,780	12	0,100	0,464	-1,08
<i>Htr3a</i>	-0,687	12	0,505	0,705	-1,05
<i>Gabra2</i>	-0,482	12	0,638	0,782	-1,03
<i>*Maoa</i>	-2,580	12	0,024	0,207	-1,14
<i>Npy1r</i>	-1,763	12	0,103	0,387	-1,05
<i>Npy5r</i>	-1,122	12	0,284	0,532	-1,05
<i>Prima1</i>	1,669	7,277	0,137	0,403	2,51
<i>Anxa9</i>	-1,376	12	0,194	0,485	-1,47
<i>**Slc5a7</i>	-4,772	12	0,0005	0,027	-1,35
<i>Sstr1</i>	-1,195	12	0,255	0,528	-1,10
<i>Sstr2</i>	0,344	12	0,737	0,834	1,08
<i>Sstr3</i>	-0,821	12	0,428	0,626	-1,08
<i>Sstr4</i>	1,410	12	0,184	0,480	1,10
<i>Tacr1</i>	-0,573	12	0,577	0,769	-1,13
<i>*Tacr3</i>	-2,681	12	0,020	0,200	-1,14
<i>Th</i>	1,518	7,916	0,168	0,443	1,12

(\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplas comparações

(\*\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) corrigido para múltiplas comparações pelo teste de Benjamini & Hochberg (FDR – *False Discovering Rate*).

**Tabela 6.** Resultados da expressão gênica no *nucleus accumbens* entre as linhagens SHR e Wistar tratados com **veículo**.

Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	<i>Fold Regulation</i>
	t	g	p	p-corrigido	
<i>Abat</i>	0,985	14	0,341	0,853	1,17
<i>Ache</i>	0,110	14	0,914	0,986	1,01
<i>Cckbr</i>	0,056	14	0,956	0,974	1,01
<i>Chat</i>	0,824	14	0,424	0,804	1,20
<i>Chrm1</i>	1,073	14	0,301	0,975	1,06
<i>Chrm2</i>	-1,455	14	0,334	0,875	-1,29
<i>Chrm3</i>	-0,659	14	0,921	0,974	-1,19
<i>Chrm4</i>	1,061	14	0,307	0,888	1,14
<i>Chrm5</i>	1,710	14	0,109	0,859	1,68
<i>Chrna2</i>	1,363	14	0,194	0,891	1,18
<i>Chrna3</i>	0,890	14	0,388	0,791	1,05
<i>Chrna4</i>	-0,661	14	0,519	0,865	-1,74
<i>Chrna5</i>	-1,538	14	0,146	0,805	-1,35
<i>Chrna6</i>	-0,819	3,51	0,328	0,901	-1,13
<i>Chrb1</i>	-0,138	14	0,892	1,002	-1,03
<i>Chrb2</i>	-0,222	14	0,827	1,034	-1,04
<i>Chrne</i>	0,834	14	0,126	0,768	1,27
<i>Chrng</i>	0,685	14	0,185	0,923	1,80
<i>Comt</i>	-0,170	14	0,867	1,060	-1,05
<i>Drd1a</i>	1,100	14	0,290	0,996	1,29
<i>Drd2</i>	0,548	14	0,592	0,958	1,09
<i>Drd3</i>	0,280	14	0,783	1,026	1,24
<i>Gabra1</i>	-0,074	14	0,942	0,977	-1,05
<i>Gabra3</i>	-0,910	14	0,378	0,800	-1,25
<i>Gabra4</i>	0,911	14	0,378	0,831	1,09
<i>Gabra5</i>	0,121	14	0,875	1,046	-1,01
<i>Gabrb2</i>	-0,578	14	0,877	1,026	-1,02
<i>Gabrb3</i>	-0,464	14	0,650	0,941	-1,06
<i>Gabrd</i>	0,146	14	0,305	0,933	1,06
<i>Gabrg1</i>	-1,067	14	0,237	0,930	1,00
<i>Gabrg2</i>	1,271	14	0,224	0,950	1,04
<i>*Gabrr2</i>	-3,200	14	0,010	0,266	-3,47
<i>Gad1</i>	0,715	14	0,802	1,026	-1,02
<i>Gad2</i>	0,961	14	0,353	0,809	1,15
<i>Gla2</i>	-0,021	14	0,983	0,983	-1,04
<i>Gla3</i>	-1,113	14	0,626	0,956	-1,10
<i>Glr</i>	0,788	14	0,444	0,813	1,04
<i>*Prhr</i>	3,322	14	0,011	0,202	1,50

Continua

<i>Qrfpr</i>	-0,916	14	0,881	1,010	-1,14
<i>Prokr2</i>	-0,688	14	0,503	0,864	-1,15
<i>Gpr83</i>	0,386	14	0,705	0,970	1,03
<i>Htr3a</i>	1,221	14	0,242	0,888	1,13
<i>Gabra2</i>	2,176	14	0,048	0,526	1,14
<i>Maoa</i>	-0,469	14	0,646	0,960	-1,08
<i>*Nmur2</i>	-3,621	14	0,013	0,173	-3,14
<i>Npy1r</i>	-0,359	14	0,620	0,975	1,03
<i>Npy5r</i>	0,639	14	0,117	0,801	1,26
<i>Prima1</i>	0,462	14	0,651	0,918	1,64
<i>*Anxa9</i>	-3,730	14	0,002	0,123	-1,44
<i>Slc5a7</i>	-0,067	14	0,453	0,803	-1,23
<i>Sstr1</i>	-0,324	14	0,750	1,007	-1,45
<i>Sstr2</i>	0,515	14	0,900	0,990	-1,03
<i>Sstr4</i>	-0,977	14	0,345	0,825	-1,13
<i>Tacr1</i>	1,345	14	0,418	0,820	1,18
<i>Tacr3</i>	2,089	14	0,055	0,508	1,81

(\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplas comparações

(\*\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) corrigido para múltiplas comparações pelo teste de Benjamini & Hochberg (FDR – *False Discovering Rate*).

**Tabela 7.** Resultados da expressão gênica no **sangue periférico** entre as linhagens SHR e Wistar tratados com **veículo**.

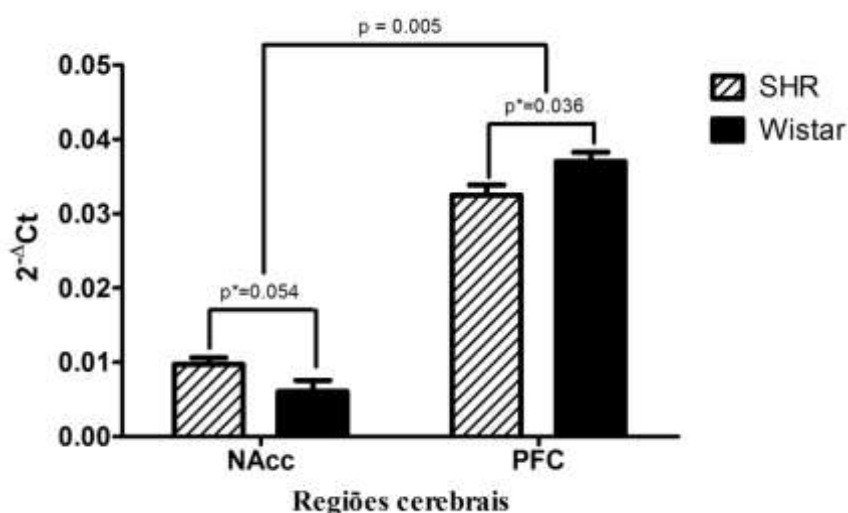
Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	<i>Fold Regulation</i>
	t	g	p	p-corrigido	
<i>Ache</i>	-0,691	11	0,504	0,616	1,13
<i>Chrne</i>	-0,262	11	0,798	0,798	-1,70
<i>Chrng</i>	-0,942	11	0,366	0,504	-1,68
<i>Comt</i>	1,044	11	0,319	0,501	1,29
<i>Drd1a</i>	-1,966	4,6	0,111	0,361	-5,29
<i>Gabra1</i>	0,212	11	0,836	0,686	1,02
<i>Gabbr2</i>	-1,045	11	0,318	0,583	-1,39
<i>Qrfpr</i>	0,507	11	0,622	0,684	-1,24
<i>*Maoa</i>	-2,587	11	0,025	0,139	-2,18
<i>Sstr3</i>	-0,420	11	0,682	0,420	1,38
<i>**Sstr4</i>	-5,890	11	0,000	0,001	-2,56

(\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplas comparações

(\*\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) corrigido para múltiplas comparações pelo teste de Benjamini & Hochberg (FDR – *False Discovering Rate*).

### 5.2.1 Interação dos genes diferencialmente expressos no CPF e NAcc

Dentre os genes diferencialmente expressos no teste-T (sem o FDR), nós verificamos se algum gene se expressava diferentemente entre as linhagens e a região cerebral (CPF e NAcc), em outras palavras se algum gene estava hipoexpresso em uma região de uma das linhagens e hiperexpresso na outra. Nessa análise, encontramos que o gene receptor de taquicininina 3 (*Tacr3* ou *Nk3r*) estava hiperexpresso no NAcc do SHR e hipoexpresso no CPF (Figura 4).



**Figura 4.** ANOVA de duas vias realizada para o gene *Tacr3*. \*Valor de p não corrigido.

### 5.3 SHR não tratado x SHR tratado

Na comparação entre os ratos SHR tratados com veículo e os ratos tratados com os antipsicóticos risperidona, clozapina e haloperidol, encontramos, após a correção FDR, três genes diferencialmente expressos no CPF dos animais tratados com clozapina (*Drd2*, *Drd3* e *Brs3*) e dois no CPF dos ratos tratados com haloperidol (*Brs3*, *Sstr4*). Curiosamente, o gene *Prnal* se mostrou hiperexpresso, com *fold regulation* superior a 1,6, nos três tratamentos no NAcc, e no tratamento clozapina e haloperidol no CPF. As tabelas a seguir exibem os resultados encontrados na comparação entre SHR não tratado e SHR tratado com antipsicóticos para cada

tecido (NAcc, CPF, SP). Neste caso o SHR tratado com solução salina é o controle, de tal forma que os valores de *Fold Regulation* indicam quantas vezes o gene está hipo ou hiperexpresso nos animais tratados com antipsicótico.

**Tabela 8.** Resultados da expressão gênica no **córtex pré-frontal** entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com **risperidona**.

Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	<i>Fold Regulation</i>
	t	g	p	p-corrigido	
<i>Abat</i>	0,473	13	0,644	1,188	-1,05
<i>Ache</i>	0,602	7,899	0,564	1,161	-1,07
<i>Brs3</i>	0,315	13	0,758	1,049	-1,07
<i>Cckar</i>	-0,875	12	0,399	1,305	1,23
<i>Cckbr</i>	0,618	7,301	0,555	1,176	-1,08
<i>Chrm1</i>	0,144	13	0,888	0,999	-1,02
<i>Chrm2</i>	1,524	13	0,151	1,557	-1,12
<i>Chrm3</i>	-0,344	13	0,737	1,128	1,05
<i>Chrm4</i>	0,116	12	0,910	0,993	-1,02
<i>Chrm5</i>	0,946	13	0,361	1,301	-1,32
<i>Chrna2</i>	-0,859	12	0,407	1,274	1,07
<i>Chrna3</i>	-0,127	13	0,901	0,998	1,01
<i>Chrna4</i>	0,832	13	0,421	1,165	-1,08
<i>Chrna5</i>	1,680	13	0,117	1,683	-1,33
<i>Chrna6</i>	0,070	10	0,946	1,001	1,43
<i>Chrb1</i>	1,265	13	0,228	1,643	-1,19
<i>Chrb2</i>	1,088	13	0,296	1,422	-1,18
<i>Chrb3</i>	0,635	13	0,536	1,245	-1,57
<i>Chrnd</i>	-0,241	12	0,814	0,993	1,06
<i>Chrne</i>	-0,908	13	0,381	1,305	1,12
<i>Chrng</i>	0,336	13	0,742	1,090	-1,17
<i>Comt</i>	-0,377	13	0,712	1,140	1,03
<i>Drd1a</i>	1,841	13	0,088	3,186	-1,29
<i>Drd2</i>	1,649	13	0,123	1,478	-1,10
<i>Drd3</i>	-0,341	12	0,739	1,108	1,07
<i>Drd5</i>	0,434	13	0,671	1,179	-1,07
<i>Gabra1</i>	-0,620	13	0,546	1,191	1,05
<i>Gabra3</i>	1,039	13	0,318	1,345	-1,08
<i>Gabra4</i>	-0,173	13	0,865	0,988	1,02
<i>Gabra5</i>	1,103	13	0,290	1,492	-1,09
<i>Gabra6</i>	-0,263	13	0,797	1,043	1,05
<i>Gabrb2</i>	0,192	13	0,851	1,004	-1,02

Continua

<b><i>Gabrb3</i></b>	-0,208	13	0,838	1,006	1,01
<b><i>Gabrd</i></b>	-0,370	13	0,718	1,123	1,03
<b><i>Gabrg1</i></b>	-0,630	13	0,539	1,213	1,05
<b><i>Gabrg2</i></b>	0,295	13	0,772	1,049	-1,02
<b><i>Gabrq</i></b>	0,852	12	0,411	1,183	-1,10
<b><i>Gabrr1</i></b>	0,380	13	0,710	1,161	-1,09
<b><i>Gabrr2</i></b>	0,965	13	0,352	1,335	-1,10
<b><i>Gad1</i></b>	0,814	13	0,430	1,147	-1,06
<b><i>Gad2</i></b>	0,407	13	0,691	1,156	-1,03
<b><i>Galr1</i></b>	0,763	13	0,459	1,181	-1,12
<b><i>Galr3</i></b>	-0,256	12	0,802	1,032	1,06
<b><i>*Gla1</i></b>	3,142	13	0,008	0,561	-1,81
<b><i>Gla2</i></b>	-1,361	13	0,197	1,770	1,19
<b><i>Gla3</i></b>	0,557	13	0,587	1,142	-1,06
<b><i>Glr1</i></b>	0,244	13	0,811	1,006	-1,01
<b><i>Prlhr</i></b>	-0,295	13	0,772	1,030	1,05
<b><i>Qrfpr</i></b>	0,451	13	0,660	1,187	-1,06
<b><i>Prokr2</i></b>	1,139	13	0,275	1,652	-1,11
<b><i>Npffr2</i></b>	-0,988	12	0,343	1,371	1,43
<b><i>Gpr83</i></b>	0,316	13	0,757	1,069	-1,04
<b><i>Grpr</i></b>	-0,578	13	0,573	1,147	1,04
<b><i>Htr3a</i></b>	-0,498	13	0,627	1,188	1,03
<b><i>Gabra2</i></b>	-0,246	13	0,810	1,023	1,02
<b><i>Maoa</i></b>	0,716	13	0,487	1,209	-1,04
<b><i>Mc2r</i></b>	-0,004	12	0,997	0,997	-1,04
<b><i>Nmur1</i></b>	0,176	13	0,863	1,002	-1,02
<b><i>Nmur2</i></b>	0,047	13	0,963	1,005	-1,03
<b><i>Npy1r</i></b>	-0,324	13	0,751	1,081	1,02
<b><i>Npy5r</i></b>	0,012	13	0,991	1,005	-1,00
<b><i>Ppyr1</i></b>	-0,024	13	0,981	1,009	1,00
<b><i>Prma1</i></b>	-0,076	13	0,941	1,011	1,05
<b><i>Anxa9</i></b>	-0,854	12	0,410	1,230	1,09
<b><i>Slc5a7</i></b>	1,052	13	0,312	1,404	-1,11
<b><i>Sstr1</i></b>	1,146	10,864	0,276	1,530	-1,16
<b><i>Sstr2</i></b>	1,803	13	0,095	2,271	-1,25
<b><i>Sstr3</i></b>	0,713	13	0,488	1,172	-1,10
<b><i>Sstr4</i></b>	1,150	12	0,273	1,784	-1,11
<b><i>Tacr1</i></b>	-0,428	13	0,676	1,159	1,08
<b><i>Tacr3</i></b>	1,267	13	0,228	1,820	-1,10
<b><i>Th</i></b>	1,783	13	0,098	1,762	-1,30

(\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplas comparações

(\*\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) corrigido para múltiplas comparações pelo teste de Benjamini & Hochberg (FDR – *False Discovering Rate*).



**Tabela 9.** Resultados da expressão gênica no *nucleus accumbens* entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com **risperidona**.

Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	<i>Fold Regulation</i>
	t	g	p	p-corrigido	
<i>Abat</i>	-1,788	14	0,095	1,221	1,29
<i>Ache</i>	-1,043	13	0,316	1,064	1,14
<i>Brs3</i>	0,336	14	0,742	1,032	-1,10
<i>Cckar</i>	0,536	14	0,600	1,097	-1,13
<i>Cckbr</i>	-0,772	14	0,453	1,115	1,12
<i>Chat</i>	-0,765	14	0,457	1,044	1,19
<i>Chrm1</i>	-1,517	14	0,151	0,881	1,18
<i>Chrm2</i>	0,317	14	0,756	1,029	-1,07
<i>Chrm3</i>	-0,366	14	0,720	1,072	1,15
<i>Chrm4</i>	-1,986	14	0,067	1,428	1,32
<i>Chrm5</i>	0,737	14	0,473	1,044	-1,22
<i>Chrna2</i>	1,547	14	0,144	1,026	-1,23
<i>Chrna3</i>	-0,266	9,024	0,796	1,019	1,05
<i>Chrna4</i>	-0,089	14	0,930	1,026	1,04
<i>Chrna5</i>	-0,059	14	0,954	1,017	1,01
<i>Chrb1</i>	-1,148	14	0,270	0,961	1,16
<i>Chrb2</i>	-0,765	14	0,457	1,083	1,12
<i>Chrne</i>	0,213	14	0,834	0,989	-1,03
<i>Chrng</i>	1,021	14	0,325	1,039	-1,21
<i>Comt</i>	-0,125	10,322	0,903	1,014	1,01
<i>Drd1a</i>	-1,199	14	0,250	0,943	1,27
<i>Drd2</i>	-0,715	14	0,487	1,005	1,16
<i>Drd3</i>	0,013	14	0,990	0,990	-1,00
<i>Drd5</i>	-1,292	14	0,217	0,993	1,46
<i>Gabra1</i>	0,519	14	0,612	1,059	-1,14
<i>Gabra3</i>	-0,509	14	0,619	1,042	1,14
<i>Gabra4</i>	-0,880	14	0,394	1,050	1,13
<i>Gabra5</i>	0,428	14	0,675	1,054	-1,09
<i>Gabra6</i>	1,636	14	0,124	0,993	-1,55
<i>Gabrb2</i>	-0,985	14	0,342	1,041	1,13
<i>Gabrb3</i>	-1,275	14	0,223	0,952	1,08
<i>Gabrd</i>	-1,745	14	0,103	1,098	1,19
<i>Gabrg1</i>	-0,017	14	0,986	1,018	1,00
<i>Gabrg2</i>	-0,880	14	0,394	1,095	1,06
<i>Gabrq</i>	0,529	14	0,605	1,075	-1,14
<i>Gabrr1</i>	1,813	14	0,091	1,461	-1,50
<i>Gad1</i>	-0,638	14	0,534	1,035	1,08
<i>Gad2</i>	-0,292	14	0,774	1,032	1,05
<i>Galr3</i>	1,201	14	0,250	0,998	-1,23

Continua

<i>Gla2</i>	0,341	14	0,738	1,074	-1,08
<i>Gla3</i>	0,145	14	0,887	1,013	-1,03
<i>Glr3</i>	-0,933	14	0,367	1,067	1,13
<i>Prlhr</i>	0,790	14	0,443	1,133	-1,11
<i>Qrfpr</i>	0,267	14	0,793	1,036	-1,10
<i>Prokr2</i>	0,224	14	0,826	0,997	-1,05
<i>Gpr83</i>	-1,337	14	0,203	0,998	1,18
<i>Htr3a</i>	0,017	14	0,987	1,003	-1,00
<i>Gabra2</i>	-0,033	14	0,974	1,022	1,00
<i>Maoa</i>	0,240	14	0,814	1,002	-1,02
<i>Mc2r</i>	1,755	11	0,107	0,978	-1,77
<i>Npy1r</i>	-0,468	14	0,647	1,062	1,13
<i>Npy5r</i>	0,339	9,994	0,742	1,055	-1,05
<i>Ppyr1</i>	1,521	14	0,151	0,963	-1,68
<i>*Prima1</i>	-2,238	14	0,042	1,345	1,77
<i>Anxa9</i>	-0,071	14	0,945	1,025	1,01
<i>Slc5a7</i>	-0,689	14	0,502	1,004	1,13
<i>Sstr1</i>	-0,543	14	0,596	1,122	1,32
<i>Sstr2</i>	-0,247	14	0,808	1,014	1,06
<i>Sstr3</i>	-0,379	14	0,711	1,083	1,25
<i>Sstr4</i>	-1,366	14	0,193	1,032	1,21
<i>Sstr5</i>	-0,158	14	0,877	1,021	1,06
<i>Tacr1</i>	0,732	13	0,477	1,018	-1,18
<i>Tacr3</i>	0,443	14	0,665	1,063	-1,07
<i>*Th</i>	2,553	14	0,023	1,472	-1,45

(\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplas comparações

(\*\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) corrigido para múltiplas comparações pelo teste de Benjamini & Hochberg (FDR – *False Discovering Rate*).

**Tabela 10.** Resultados da expressão gênica no **sangue periférico** entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com **risperidona**.

Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	<i>Fold Regulation</i>
	t	g	p	p-corrigido	
<i>Ache</i>	-0,162	11	0,874	1,020	1,22
<i>Chrne</i>	0,512	11	0,619	1,083	-1,08
<i>Chrng</i>	-0,912	11	0,381	0,890	1,34
<i>Comt</i>	0,254	11	0,804	1,125	-1,12
<i>Gabrr2</i>	1,352	11	0,204	0,713	-1,39
<i>Qrfpr</i>	-1,855	11	0,091	0,634	1,18
<i>Sstr3</i>	0,095	10	0,926	0,926	-1,15

**Tabela 11.** Resultados da expressão gênica no **córtex pré-frontal** entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com **clozapina**.

Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	<i>Fold Regulation</i>
	t	g	p	p-corrigido	
<i>*Abat</i>	2,226	11	0,048	0,172	-1,21
<i>Ache</i>	1,651	7,794	0,138	0,344	-1,23
<i>**Brs3</i>	4,605	11	0,001	0,027	-6,66
<i>*Cckar</i>	2,991	6,601	0,022	0,111	-3,40
<i>Cckbr</i>	0,986	6,835	0,358	0,585	-1,13
<i>Chrm1</i>	0,271	6,897	0,795	0,867	-1,03
<i>Chrm2</i>	0,458	11	0,656	0,774	-1,05
<i>Chrm3</i>	-0,606	11	0,557	0,729	1,07
<i>Chrm4</i>	-0,010	10	0,992	0,992	-1,01
<i>Chrm5</i>	2,030	11	0,067	0,231	-1,78
<i>Chrna2</i>	1,073	10	0,308	0,542	-1,12
<i>*Chrna3</i>	2,823	11	0,017	0,092	-1,35
<i>Chrna4</i>	1,151	11	0,274	0,506	-1,13
<i>Chrna5</i>	1,558	11	0,148	0,343	-1,34
<i>Chrna6</i>	0,193	9	0,851	0,914	---
<i>*Chrnbl</i>	2,474	11	0,031	0,139	-1,56
<i>Chrnbl2</i>	0,356	6,677	0,733	0,838	-1,05
<i>Chrnbl3</i>	1,466	7,137	0,185	0,417	---
<i>*Chrnd</i>	3,285	6,661	0,014	0,103	-2,75
<i>Chrne</i>	-0,773	11	0,456	0,631	1,06
<i>Chrng</i>	2,116	6,008	0,079	0,236	-6,01
<i>Comt</i>	1,216	11	0,249	0,485	-1,08
<i>Drd1a</i>	1,563	11	0,146	0,351	-1,26
<i>**Drd2</i>	4,431	11	0,001	0,024	-1,31
<i>**Drd3</i>	5,126	10	0,000	0,032	-3,48
<i>Drd5</i>	0,583	11	0,572	0,722	-1,11
<i>Gabra1</i>	-1,195	11	0,257	0,487	1,10
<i>Gabra3</i>	0,814	11	0,433	0,624	-1,07
<i>Gabra4</i>	-0,116	11	0,910	0,949	-0,99
<i>Gabra5</i>	1,779	11	0,103	0,285	-1,14
<i>*Gabra6</i>	3,035	11	0,011	0,117	-1,81
<i>Gabrb2</i>	0,832	6,648	0,435	0,613	-1,05
<i>Gabrb3</i>	1,675	11	0,122	0,326	-1,09
<i>Gabrd</i>	0,181	11	0,860	0,910	-1,03
<i>Gabrg1</i>	0,718	11	0,488	0,662	-1,07
<i>Gabrg2</i>	0,052	11	0,959	0,973	-1,01
<i>Gabrq</i>	1,238	10	0,244	0,488	-1,21
<i>*Gabrr1</i>	3,771	7,003	0,007	0,100	-3,01
<i>Gabrr2</i>	1,107	7,810	0,301	0,542	-1,12
<i>Gad1</i>	0,615	7,247	0,558	0,717	-1,04

Continua

<i>Gad2</i>	0,928	8,348	0,379	0,581	-1,06
<i>*Galr1</i>	2,646	7,082	0,033	0,139	-1,63
<i>*Galr3</i>	3,496	5,658	0,014	0,113	-3,25
<i>Gla1</i>	1,363	11	0,200	0,437	-1,70
<i>*Gla2</i>	-2,997	10	0,013	0,121	1,47
<i>Gla3</i>	1,869	11	0,088	0,255	-1,19
<i>Glr1b</i>	-0,569	11	0,581	0,697	1,02
<i>Prlhr</i>	0,922	11	0,376	0,589	-1,18
<i>Qrfpr</i>	0,643	8,481	0,537	0,716	-1,08
<i>Prokr2</i>	0,583	7,216	0,578	0,705	-1,09
<i>Npyffr2</i>	0,435	8	0,675	0,784	---
<i>Gpr83</i>	1,618	11	0,134	0,344	-1,18
<i>Grpr</i>	1,305	11	0,219	0,463	-1,13
<i>Htr3a</i>	0,578	11	0,575	0,714	-1,05
<i>Gabra2</i>	-0,338	11	0,742	0,835	1,02
<i>*Maoa</i>	2,264	11	0,045	0,170	-1,12
<i>Mc2r</i>	1,982	10	0,076	0,248	-2,91
<i>Nmur1</i>	1,004	11	0,337	0,564	-1,22
<i>*Nmur2</i>	2,842	6,008	0,029	0,141	-26,98
<i>Npy1r</i>	-0,060	11	0,953	0,980	1,00
<i>Npy5r</i>	0,859	8,037	0,415	0,610	-1,06
<i>*Ppyr1</i>	3,697	11	0,004	0,063	---
<i>*Prima1</i>	-2,389	8,001	0,044	0,176	2,01
<i>Anxa9</i>	-0,304	10	0,767	0,850	1,02
<i>Slc5a7</i>	0,881	11	0,397	0,596	-1,09
<i>Sstr1</i>	1,016	11	0,331	0,568	-1,08
<i>*Sstr2</i>	2,901	11	0,014	0,094	-1,44
<i>Sstr3</i>	0,948	11	0,364	0,582	-1,11
<i>*Sstr4</i>	3,197	10	0,010	0,114	-1,23
<i>Tacr1</i>	1,287	11	0,225	0,462	-1,37
<i>Tacr3</i>	1,960	11	0,076	0,237	-1,15
<i>*Th</i>	3,183	6,818	0,016	0,096	-1,61

(\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplas comparações

(\*\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) corrigido para múltiplas comparações pelo teste de Benjamini & Hochberg (FDR – *False Discovering Rate*).

**Tabela 12.** Resultados da expressão gênica no *nucleus accumbens* entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com **clozapina**.

Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	<i>Fold Regulation</i>
	t	g	p	p-corrigido	
<i>Abat</i>	-0,571	12	0,578	0,771	1,06
<i>Ache</i>	-0,752	12	0,466	0,694	1,08
<i>Brs3</i>	1,520	12	0,154	0,429	-1,80
<i>*Cckar</i>	2,397	12	0,034	0,240	-2,01
<i>Cckbr</i>	-1,494	12	0,161	0,429	1,17
<i>Chat</i>	-0,886	12	0,393	0,629	1,15
<i>*Chrm1</i>	-2,519	12	0,027	0,288	1,19
<i>*Chrm2</i>	-2,207	12	0,048	0,276	1,45
<i>Chrm3</i>	-1,625	12	0,130	0,416	1,47
<i>Chrm4</i>	-0,830	12	0,423	0,644	1,09
<i>Chrm5</i>	1,336	12	0,206	0,489	-1,74
<i>Chrna2</i>	0,987	9,420	0,348	0,603	-1,11
<i>Chrna3</i>	-0,222	12	0,828	0,883	1,01
<i>Chrna4</i>	-1,014	12	0,331	0,588	1,15
<i>Chrna5</i>	-1,244	12	0,237	0,475	1,20
<i>Chrb1</i>	-1,749	12	0,106	0,423	1,19
<i>*Chrb2</i>	-2,381	12	0,035	0,222	1,30
<i>Chrne</i>	-1,544	12	0,148	0,432	1,23
<i>*Chrng</i>	4,518	8,789	0,002	0,099	-2,93
<i>Comt</i>	-1,197	12	0,254	0,493	1,11
<i>Drd1a</i>	-0,074	12	0,942	0,957	-1,03
<i>Drd2</i>	0,110	12	0,914	0,943	-1,07
<i>Drd3</i>	0,026	12	0,980	0,980	-1,12
<i>Drd5</i>	-1,567	12	0,143	0,436	1,35
<i>Gabra1</i>	-1,299	12	0,218	0,499	1,28
<i>Gabra3</i>	-1,449	12	0,173	0,425	1,27
<i>Gabra4</i>	-0,678	12	0,511	0,727	1,08
<i>Gabra5</i>	-1,717	12	0,112	0,397	1,24
<i>*Gabra6</i>	2,887	8,051	0,020	0,258	-2,39
<i>Gabrb2</i>	-1,486	12	0,163	0,417	1,15
<i>Gabrb3</i>	-0,282	9,956	0,784	0,865	-0,99
<i>Gabrd</i>	-0,727	12	0,481	0,700	1,07
<i>Gabrg1</i>	-1,111	12	0,288	0,542	1,06
<i>Gabrg2</i>	-0,472	12	0,645	0,794	1,03
<i>Gabrq</i>	-1,290	12	0,221	0,472	1,25
<i>*Gabrr1</i>	2,955	12	0,012	0,385	-1,86
<i>Gad1</i>	-0,445	12	0,664	0,787	1,04
<i>Gad2</i>	0,454	12	0,658	0,795	-1,11
<i>*Galr3</i>	2,466	12	0,030	0,238	-1,97
<i>Gla2</i>	-2,142	12	0,053	0,285	1,39

Continua

<b><i>Gla3</i></b>	0,494	12	0,630	0,807	-1,10
<b><i>Glr3</i></b>	-1,718	12	0,112	0,420	1,20
<b><i>Prlhr</i></b>	0,490	12	0,633	0,795	-1,12
<b><i>Qrfpr</i></b>	-1,244	12	0,237	0,490	1,35
<b><i>Prokr2</i></b>	-0,150	12	0,884	0,927	1,00
<b><i>Gpr83</i></b>	-0,495	12	0,629	0,822	1,05
<b><i>Htr3a</i></b>	0,421	9,984	0,683	0,794	-1,06
<b><i>Gabra2</i></b>	-1,296	12	0,219	0,484	1,08
<b><i>Maoa</i></b>	-1,807	12	0,096	0,409	1,17
<b><i>Mc2r</i></b>	2,042	11	0,066	0,301	-1,70
<b><i>Npy1r</i></b>	-1,104	12	0,291	0,533	1,19
<b><i>Npy5r</i></b>	-0,675	12	0,513	0,698	1,05
<b><i>Ppyr1</i></b>	2,091	10,241	0,062	0,307	-2,17
<b><i>*Prima1</i></b>	-2,757	12	0,017	0,278	1,97
<b><i>*Anxa9</i></b>	-2,835	12	0,015	0,320	1,29
<b><i>Slc5a7</i></b>	-0,233	12	0,820	0,889	1,01
<b><i>Sstr1</i></b>	-0,975	12	0,349	0,587	1,21
<b><i>Sstr2</i></b>	-0,675	12	0,513	0,713	1,07
<b><i>Sstr3</i></b>	-0,888	12	0,392	0,643	1,05
<b><i>Sstr4</i></b>	-1,691	12	0,117	0,393	1,19
<b><i>*Sstr5</i></b>	2,691	7,843	0,028	0,255	-2,06
<b><i>Tacr1</i></b>	0,328	12	0,749	0,841	-1,11
<b><i>Tacr3</i></b>	-0,879	12	0,397	0,620	1,10
<b><i>Th</i></b>	0,370	12	0,718	0,821	-1,10

(\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplas comparações

(\*\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) corrigido para múltiplas comparações pelo teste de Benjamini & Hochberg (FDR – *False Discovering Rate*).

**Tabela 13.** Resultados da expressão gênica no **córtex pré-frontal** entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com **haloperidol**.

Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	<i>Fold Regulation</i>
	t	g	p	p-corrigido	
<i>*Abat</i>	3,071	11	0,011	0,085	-1,37
<i>*Ache</i>	2,571	9,195	0,030	0,119	-1,44
<i>**Brs3</i>	4,437	11	0,001	0,036	-5,20
<i>Cckar</i>	1,648	10	0,130	0,254	-2,01
<i>Cckbr</i>	1,291	8,171	0,232	0,363	-1,20
<i>Chrm1</i>	0,565	6,925	0,590	0,697	-1,07
<i>Chrm2</i>	0,678	11	0,512	0,635	-1,07
<i>Chrm3</i>	0,934	11	0,370	0,493	-1,13
<i>Chrm4</i>	0,555	10	0,591	0,686	-1,15
<i>Chrm5</i>	1,394	11	0,191	0,327	-1,57
<i>*Chrna2</i>	2,310	10	0,043	0,125	-1,37
<i>*Chrna3</i>	3,214	11	0,008	0,085	-1,36
<i>*Chrna4</i>	2,352	11	0,038	0,120	-1,32
<i>Chrna5</i>	2,445	11	0,033	0,117	-1,55
<i>Chrna6</i>	0,208	9	0,840	0,889	---
<i>*Chrb1</i>	2,818	7,169	0,025	0,114	-1,54
<i>Chrb2</i>	1,369	7,653	0,210	0,351	-1,23
<i>Chrb3</i>	0,434	11	0,673	0,745	-4,68
<i>*Chrnd</i>	2,641	11	0,023	0,127	-2,67
<i>Chrne</i>	-0,459	11	0,655	0,748	1,03
<i>Chrng</i>	1,806	11	0,098	0,208	-5,40
<i>Comt</i>	1,455	11	0,174	0,320	-1,10
<i>*Drd1a</i>	2,426	11	0,034	0,110	-1,47
<i>*Drd2</i>	3,562	11	0,004	0,064	-1,32
<i>*Drd3</i>	4,045	10	0,002	0,056	-3,14
<i>Drd5</i>	0,947	11	0,364	0,495	-1,16
<i>Gabra1</i>	-1,197	11	0,256	0,377	1,11
<i>Gabra3</i>	0,875	11	0,400	0,524	-1,08
<i>Gabra4</i>	-0,411	11	0,689	0,752	1,03
<i>Gabra5</i>	1,032	11	0,324	0,449	-1,10
<i>*Gabra6</i>	2,746	7,265	0,028	0,117	-1,45
<i>Gabrb2</i>	1,124	11	0,285	0,402	-1,08
<i>Gabrb3</i>	1,409	11	0,186	0,327	-1,12
<i>*Gabrd</i>	2,298	11	0,042	0,127	-1,21
<i>Gabrg1</i>	2,135	11	0,056	0,150	-1,20
<i>Gabrg2</i>	0,774	11	0,455	0,585	-1,05
<i>Gabrq</i>	-0,141	10	0,891	0,903	1,00

Continua

<i>*Gabrr1</i>	3,524	11	0,005	0,057	-3,13
<i>Gabrr2</i>	1,218	11	0,249	0,373	-1,15
<i>Gad1</i>	0,669	11	0,517	0,631	-1,06
<i>Gad2</i>	1,320	11	0,214	0,350	-1,11
<i>Galr1</i>	1,758	11	0,106	0,219	-1,53
<i>*Galr3</i>	3,135	6,195	0,019	0,116	-2,81
<i>*Gla1</i>	5,489	7,237	0,001	0,059	-4,07
<i>Gla2</i>	-1,860	11	0,090	0,196	1,24
<i>*Gla3</i>	2,207	11	0,050	0,137	-1,21
<i>Glr1b</i>	0,177	11	0,863	0,888	-1,01
<i>Prlhr</i>	1,986	11	0,072	0,174	-1,40
<i>Qrfpr</i>	0,774	11	0,456	0,575	-1,11
<i>Prokr2</i>	2,051	11	0,065	0,161	-1,21
<i>Npffr2</i>	0,664	8	0,525	0,631	---
<i>*Gpr83</i>	2,594	11	0,025	0,120	-1,32
<i>Grpr</i>	1,649	11	0,127	0,255	-1,14
<i>Htr3a</i>	1,259	11	0,234	0,358	-1,10
<i>Gabra2</i>	0,449	11	0,662	0,745	-1,04
<i>Maoa</i>	1,544	11	0,151	0,286	-1,11
<i>*Mc2r</i>	2,441	11	0,033	0,112	---
<i>*Nmur1</i>	2,604	11	0,025	0,126	-1,66
<i>*Nmur2</i>	2,798	6,020	0,031	0,118	-22,03
<i>Npy1r</i>	0,361	11	0,725	0,779	-1,03
<i>Npy5r</i>	1,454	11	0,174	0,313	-1,13
<i>*Ppyr1</i>	2,980	11	0,013	0,082	-4,19
<i>Prima1</i>	-2,198	8,407	0,058	0,148	1,94
<i>Anxa9</i>	-0,193	10	0,851	0,888	1,00
<i>Slc5a7</i>	1,133	11	0,281	0,405	-1,11
<i>Sstr1</i>	1,941	11	0,078	0,182	-1,15
<i>*Sstr2</i>	3,157	11	0,009	0,082	-1,50
<i>Sstr3</i>	1,885	11	0,086	0,194	-1,28
<i>**Sstr4</i>	3,955	10	0,003	0,049	-1,22
<i>Tacr1</i>	1,287	10,232	0,226	0,362	-1,31
<i>Tacr3</i>	-0,015	11	0,988	0,988	-1,01
<i>*Th</i>	3,183	8,420	0,012	0,087	-1,39

(\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplas comparações

(\*\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) corrigido para múltiplas comparações pelo teste de Benjamini & Hochberg (FDR – *False Discovering Rate*).



**Tabela 14.** Resultados da expressão gênica no *nucleus accumbens* entre os ratos SHR tratados com veículo e SHR tratado com **haloperidol**.

Genes	Teste de <i>T-Student</i>			FDR	<i>Fold Regulation</i>
	t	g	p	p-corrigido	
<i>Abat</i>	0,255	12	0,803	0,952	-1,09
<i>Ache</i>	-0,392	12	0,702	1,021	1,02
<i>*Brs3</i>	2,345	12	0,037	0,396	-1,95
<i>Cckar</i>	2,143	12	0,053	0,488	-3,22
<i>Cckbr</i>	-0,572	12	0,578	1,028	1,05
<i>Chat</i>	-0,557	12	0,588	1,017	1,04
<i>Chrm1</i>	-1,837	12	0,091	0,530	1,17
<i>Chrm2</i>	-0,917	12	0,377	1,097	1,13
<i>Chrm3</i>	-0,929	12	0,371	1,131	1,13
<i>Chrm4</i>	-0,406	12	0,692	1,080	1,02
<i>Chrm5</i>	0,780	12	0,450	1,067	-1,41
<i>*Chrna2</i>	2,379	12	0,035	0,446	-1,39
<i>Chrna3</i>	0,254	12	0,804	0,935	-1,10
<i>Chrna4</i>	-0,490	12	0,633	1,038	-1,24
<i>Chrna5</i>	-0,915	12	0,378	1,052	1,12
<i>Chrb1</i>	-0,635	12	0,537	1,011	1,06
<i>Chrb2</i>	-0,672	12	0,514	1,029	1,05
<i>Chrne</i>	-1,599	12	0,136	0,668	1,25
<i>Chrng</i>	2,057	12	0,062	0,497	-2,32
<i>Comt</i>	-0,269	12	0,793	0,995	1,02
<i>Drd1a</i>	0,275	12	0,788	1,009	-1,13
<i>Drd2</i>	-0,290	12	0,777	1,035	-1,00
<i>Drd3</i>	-0,041	12	0,968	0,984	-1,10
<i>Drd5</i>	-1,276	12	0,226	0,965	1,26
<i>Gabra1</i>	-0,989	12	0,342	1,153	1,16
<i>Gabra3</i>	-0,706	8,024	0,500	1,067	1,06
<i>Gabra4</i>	-0,291	12	0,776	1,057	1,02
<i>Gabra5</i>	-0,646	12	0,531	1,029	1,05
<i>Gabra6</i>	1,449	12	0,173	0,791	-2,35
<i>Gabrb2</i>	-0,792	12	0,444	1,093	1,06
<i>Gabrb3</i>	-0,733	12	0,478	1,054	1,04
<i>Gabrd</i>	-0,042	12	0,967	0,998	-1,04
<i>Gabrg1</i>	0,394	12	0,700	1,043	-1,04
<i>Gabrg2</i>	-0,394	12	0,700	1,067	1,02
<i>Gabrq</i>	-0,825	12	0,425	1,089	1,12
<i>*Gabrr1</i>	2,706	12	0,019	0,305	-3,45
<i>Gad1</i>	-0,778	12	0,452	1,033	1,09
<i>Gad2</i>	0,173	12	0,866	0,972	-1,06
<i>*Galr3</i>	3,192	12	0,008	0,496	-2,47

Continua

<i>Gla2</i>	-1,108	7,770	0,301	1,134	1,19
<i>Gla3</i>	0,826	12	0,425	1,134	-1,20
<i>Glr</i>	-1,248	6,738	0,254	1,014	1,16
<i>Prlhr</i>	1,982	12	0,071	0,504	-1,45
<i>Qrfpr</i>	0,068	12	0,947	0,994	-1,19
<i>Prokr2</i>	-0,106	12	0,918	0,995	-1,06
<i>Gpr83</i>	-0,541	12	0,599	1,008	1,05
<i>Htr3a</i>	0,281	12	0,784	1,024	-1,06
<i>Gabra2</i>	-1,054	12	0,313	1,111	1,07
<i>Maoa</i>	-0,261	12	0,799	0,964	1,00
<i>Mc2r</i>	1,662	11	0,125	0,665	-2,44
<i>Npy1r</i>	-0,970	12	0,351	1,124	1,11
<i>Npy5r</i>	0,465	6,317	0,658	1,053	-1,19
<i>*Ppyr1</i>	3,156	12	0,008	0,265	-4,77
<i>Prma1</i>	-1,890	12	0,083	0,532	1,67
<i>Anxa9</i>	-0,263	12	0,797	0,980	-1,00
<i>Slc5a7</i>	-0,034	12	0,974	0,974	-1,08
<i>Sstr1</i>	-0,674	12	0,513	1,060	-1,12
<i>Sstr2</i>	0,223	12	0,827	0,945	-1,18
<i>Sstr3</i>	-0,589	12	0,566	1,036	-1,44
<i>Sstr4</i>	-0,159	12	0,876	0,967	-1,03
<i>*Sstr5</i>	2,802	12	0,016	0,341	-3,13
<i>Tacr1</i>	0,074	12	0,942	1,005	-1,14
<i>Tacr3</i>	-0,389	12	0,704	1,001	-1,04
<i>Th</i>	-0,312	6,796	0,764	1,064	-1,03

(\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) antes da correção para múltiplas comparações

(\*\*) Genes diferencialmente expressos pela análise de teste-T ( $p < 0,05$ ) corrigido para múltiplas comparações pelo teste de Benjamini & Hochberg (FDR – *False Discovering Rate*).

#### 5.4 Correlação sangue x cérebro

A correlação sangue e cérebro foi realizada apenas nos ratos Wistar e SHR tratados com veículo, a fim de evitar fatores confundidores, tais como o uso de antipsicóticos. Para tal, utilizamos duas abordagens diferentes. Na primeira verificamos a correlação entre SP e regiões cerebrais (CPF ou NAcc) do SHR, apenas nos genes diferencialmente expressos entre as linhagens Wistar e SHR, com o intuito de encontrar biomarcadores que possam prever a condição do SHR no sangue. Na segunda abordagem visamos encontrar genes correlacionados

com o sangue e o cérebro independentemente da linhagem (Wistar ou SHR) e do tratamento (SHR tratado com veículo e SHR tratado com risperidona), verificando assim, se algum desses genes estava correlacionado com os três grupos simultaneamente.

Na primeira análise, o gene *Tacr3* mostrou correlação da expressão entre o sangue e cérebro, curiosamente, a expressão do sangue está positivamente correlacionada com o NAcc e negativamente com o CPF.

A segunda análise, envolvendo todos os ratos que possuíam a expressão gênica do sangue (SHR e Wistar tratados com veículo e SHR tratado com risperidona), não apresentou nenhum gene que estava correlacionado em todos três grupos de tratamento, apenas genes correlacionados separadamente em cada grupo.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a caracterizar a expressão de genes receptores reguladores de neurotransmissores do SHR, um novo modelo animal de esquizofrenia [68, 73, 74]. Nesse trabalho encontramos cinco genes diferencialmente expressos entre a linhagem Wistar e a linhagem SHR (*Gad2*, *Chrn4*, *Slc5a7*, *Qrfpr* no CPF e *Sstr4* no SG) e quatro genes entre animais SHR tratados e não tratados com antipsicótico (*Brs3*, *Drd2*, *Drd3* e *Sstr4* no CPF). Além disso, encontramos que a expressão do gene *Tacr3* se comporta diferente entre as linhagens SHR e Wistar dependendo da região cerebral (CPF e NAcc) e que a expressão no CPF e NAcc estão correlacionadas de forma negativa e positiva, respectivamente, com a expressão no sangue do SHR. Vale ressaltar que com o método de correção para múltiplas comparações utilizado, alguns genes como o *Gral1* (CPF: SHR-veículo x SHR-risperidona e SHR-haloperidol) perderam significância mesmo com baixos valores de p.

A Tabela 15 e 16 comparam nossos achados com a literatura, mostrando os genes diferencialmente expressos e sua relação com a esquizofrenia e outras doenças mentais ou sua relação com os antipsicóticos.

**Tabela 15.** Genes diferencialmente expressos entre a linhagem Wistar e SHR encontrados no presente estudo. Resumo dos dados da literatura quanto à esquizofrenia, outras condições psiquiátricas e estudos em modelos animais, bem como as possíveis alterações fisiopatológicas relacionadas a esses genes.

GENES	DADOS DA LITERATURA				DISCUSSÃO	
	Via relacionada	Esquizofrenia	Outras afecções	Estudos em modelos animais	Resultados	Possível alteração fenotípica no SHR
<i>Tacr3</i>	Dopaminérgica Glutamatérgica	Antagonistas desse receptor apresentam potencial antipsicótico e estão sob triagem clínica [75]	Abuso de drogas	Hipertensão no SHR [75]; Estimula a via dopaminérgica [32, 76]	↓ CPF; ↑ NAcc  NAcc ~ SP CPF ~ SP	Hipertensão
<i>Gad2</i>	GABAérgica	Diminuição da expressão de GAD em pacientes [77]; Associado a variantes em famílias Irlandesas [78]	Autismo	Déficit de PPI em camundongos <i>knockout</i> [79]	↓ CPF	Déficit de PPI
<i>Slc5a7</i>	Colinérgica	---	TDAH; Doença de Alzheimer; Depressão maior	Testes que demandam atenção aumentam a superfície de expressão de CHT [80]	↓ CPF	Déficit cognitivo
<i>Qrfpr</i>	---	---	---	Administração i.c.v. de QRFP causa aumento da atividade motora, de <i>grooming</i> e de pressão sanguínea [81]	↓ CPF	Hipertensão; atividade motora aumentada
<i>Chrn4</i>	Colinérgica	---	Tabagismo	---	↓ CPF	Déficit cognitivo

↓: Diminuição da expressão na linhagem SHR quando comparada com ratos Wistar; ↑ : Aumento da expressão na linhagem SHR quando comparada com ratos Wistar; ~: Correlação entre a expressão em SP e tecidos cerebrais na linhagem SHR; ---: Não descrito na literatura; TDAH: Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.

**Tabela 16.** Genes diferencialmente expressos entre SHR tratado e não tratado com antipsicóticos encontrados no presente estudo. Resumo dos dados da literatura quanto à esquizofrenia, efeito de antipsicóticos e estudos em modelos animais, bem como o possível efeito deste tratamento nesses genes.

GENES	REVISÃO DA LITERATURA				DISCUSSÃO	
	Via Relacionada	Esquizofrenia	Antipsicóticos	Modelos animais	Resultados	Possível efeito no SHR tratado
<i>Brs3</i>	---	Níveis de bombesina diminuída no líquido cefaloraquidiano e na urina de pacientes [82, 83]	Clozapina e haloperidol não fazem ligação direta com esse receptor [84]	Antagonistas bloqueiam a estereotipia causada por agonistas D1 e D2 [85]; Regula os efeitos do isolamento social [86]	↓ CPF • SHR clozapina • SHR haloperidol	Melhora no teste de isolamento social
<i>Prima1</i>	Colinérgica	---	Clozapina aumenta a liberação de acetilcolina no CPF e NAcc; Haloperidol no estriado; risperidona no CPF medial [87-90]	---	↑ CPF e NAcc * • SHR clozapina • SHR haloperidol  ↑ NAcc * • SHR risperidona	Melhora nos testes cognitivos
<i>Drd2 e Drd3</i>	Dopaminérgica	Efetividade dos antipsicóticos depende do antagonismo de receptores D2-like	Divergência quanto ao efeito dessas drogas na expressão gênica	---	↓ CPF • SHR clozapina	Efetividade da droga
<i>Sstr4</i>	---	Diminuição da densidade de neurônios e dos níveis de expressão gênica da somatostatina no hipocampo [91]	---	Interneurônios somatostatinérgicos do hipocampo modulam os processos de memória e aprendizagem [92]	↓ CPF • SHR haloperidol	---

↓↑ : Diminuição ou aumento da expressão no grupo SHR tratado com antipsicótico quando comparado com o SHR tratado com veículo; ---: Não descrito na literatura.\*p>0,05.

## 6.1 Genes diferencialmente expressos entre as linhagens Wistar e SHR

### 6.1.1 *Gad2*

Dois tipos da enzima glutamato descarboxilase (GAD) são encontradas no cérebro. A GAD2 sintetiza o ácido gamma-aminobutírico (GABA), preferencialmente no terminal sináptico, em vesículas que serão liberadas do neurônio, enquanto a GAD1 sintetiza o GABA citoplasmático [93-95]. Estudos de expressão *post-mortem* realizados em cérebros de pacientes afetados demonstraram a diminuição da expressão da proteína GAD1 no córtex pré-frontal e cerebelo [17], sugerindo uma redução da neurotransmissão GABAérgica. Straub et al. (2002) encontraram também associação entre a região do gene *GAD2* e famílias irlandesas com esquizofrenia [78]. Um outro estudo mostrou ainda que camundongos *knockout* para o gene *GAD2* apresentavam déficits no teste de PPI (inibição pré-pulso), déficit esse também apresentando por pacientes de esquizofrenia [79]. Da mesma forma, em nosso trabalho encontramos uma redução da expressão de *GAD2* no CPF dos ratos SHR em relação a linhagem Wistar, sugerindo também uma redução da neurotransmissão GABA, o que poderia explicar, em parte, déficits no comportamento dos animais SHR e os resultados no teste PPI encontrados por nosso grupo [67].

### 6.1.2 *Chrn4*

A via colinérgica está intimamente relacionada a déficits cognitivos em pacientes com esquizofrenia [23-26]. Desta forma, essa via vem despontando como promissora para o tratamento dos sintomas cognitivos, como por exemplo, agonistas do receptor CHRNA7 [23, 24]. Em nosso trabalho encontramos dois genes relacionados com a via da acetilcolina: *Slc5a7* e *Chrn4*.

A função do gene *Chrb4* está basicamente relacionada à dependência de nicotina, porém, Winterer et al. (2010) mostraram que variantes no *cluster* gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 podem estar associados à *performance* cognitiva e que esse déficit poderia levar indiretamente à dependência de nicotina [96]. Em nosso trabalho encontramos uma diminuição da expressão de *Chrb4* no grupo SHR em relação ao grupo Wistar, talvez esta alteração esteja relacionada à *performance* cognitiva deficiente do SHR encontrados anteriormente pelo nosso grupo [68].

### 6.1.3 *Slc5a7*

Ainda com relação a via colinérgica, o transportador pré-sináptico de colina (CHT1 ou *Slc5a7*) é o principal fator limitante para a produção da acetilcolina no cérebro [97]. Ele é o responsável pela recaptação de colina após a acetilcolina ser degradada pela acetilcolinesterase. Esse transportador parece estar associado à atenção e hiperatividade. Um estudo *ex vivo* em córtex cerebral de rato encontrou uma elevada superfície de expressão de CHT1 após testes que demandam atenção [80] e outros trabalhos encontraram que variantes desse gene estão associadas a transtornos mentais como o TDAH, depressão maior e doença de Alzheimer [98-100]. Em nosso estudo encontramos uma redução da expressão de *Slc5a7* no CPF dos ratos SHR em relação ao Wistar. Desta forma, sugerimos que esta redução pode ser a responsável pelos déficits de atenção e hiperatividade encontradas anteriormente nesta linhagem [68, 69, 74]. Matsuo et al. (2011) descreveram que a hiperexpressão da enzima colina acetiltransferase (CHAT) induz a transcrição de *Cht1* *in vitro* [101]. Curiosamente, o gene *Chat* também está menos expresso no CPF do SHR (p-corrigido=0.226; *fold*= -1.27). Coletivamente, esses resultados sugerem um déficit na neurotransmissão colinérgica do SHR, os quais podem estar associados aos déficits cognitivos, insistentemente, encontrados nesta linhagem [68].



#### 6.1.4 *Qrfpr*

O QRFP (*Pyroglutamylated RFamide peptide*) e o seu receptor têm funções ainda pouco estudadas, porém estudos encontraram que a administração de 26Rfa (um peptídeo endógeno ortólogo do QRFP) aumentava consideravelmente a ingestão de comida em camundongos e que a administração i.c.v. (intracerebroventricular) de QRFP intensifica a atividade motora, o *grooming* (atividade de se limpar), e ainda influencia a pressão sanguínea [81, 102]. Em nossos resultados, o gene *Qrfpr* mostrou-se hipoexpresso no CPF do SHR com um elevado *fold regulation* (FR) (FR=-5,29). Apesar do pouco que se sabe sobre a função deste gene, sugerimos que esta diminuição da expressão com um *FR* alto pode influenciar tanto a hipertensão quanto a hiperlocomoção do SHR.

#### 6.1.5 *Tacr3*

As taquicininas (substância P, neuroquinina A e neuroquinina B) são substâncias que participam do mecanismo de dor e inflamação do corpo humano. O receptor de taquicinina 3 (*Tacr3*) se liga preferencialmente a neuroquinina B [10, 11]. Estudos de função mostraram que o *Tacr3* está distribuído por todo o sistema nervoso dos mamíferos e que sua ativação influencia a liberação de diversos neurotransmissores [12, 13]. Esta ativação altera especialmente a liberação de neurotransmissores nas células dopaminérgicas e noradrenérgicas. Além disso, antagonistas de *Tacr3* atenuam tanto a hipofuncionabilidade cortical quanto a hiperativação mesolímbica do sistema dopaminérgico, efeitos esses necessários para o tratamento dos sintomas negativos e positivos da esquizofrenia, respectivamente [14-16]. Alguns ensaios clínicos estão testando esses antagonistas como potenciais antipsicóticos [75]. Em nosso estudo, esse receptor revelou um perfil de expressão diferenciada entre as linhagens SHR e Wistar com relação ao CPF e ao NAcc

(Figura 4), de forma que ele está hipoexpresso no CPF e hiperexpresso no NAcc do SHR em relação ao Wistar. Assim, essa alteração nas duas regiões cerebrais pode interferir em outras vias de neurotransmissão, como a dopaminérgica, levando às alterações comportamentais do SHR.

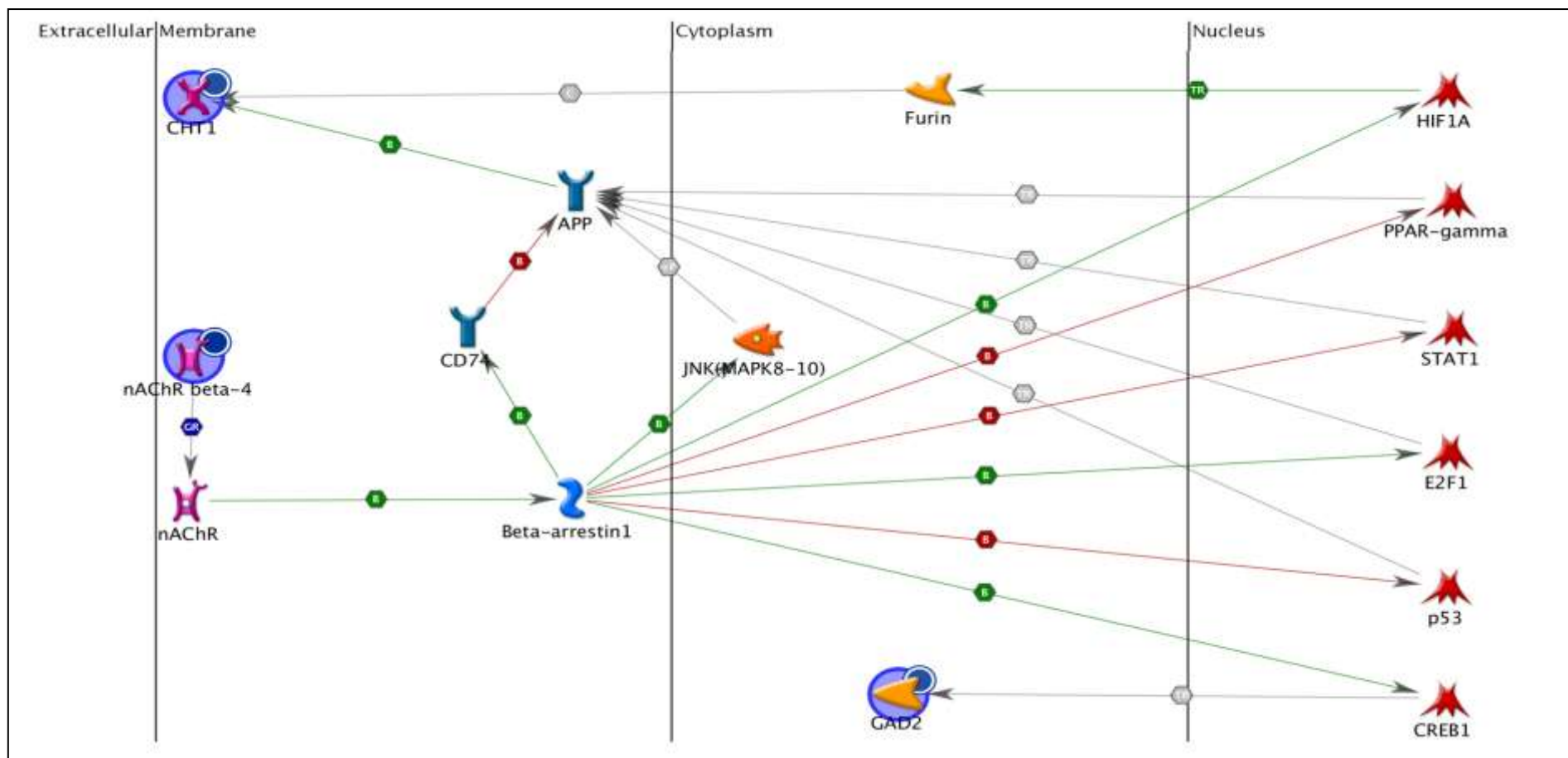
Além disso, Lessard et al. (2004) demonstraram em ratos SHR que o tratamento i.c.v com antagonistas Tacr3 têm um efeito anti-hipertensivo no animal [76]. Desta forma, esse gene pode também estar influenciando sua condição hipertensiva.

#### **6.1.6 *Sstr4***

O gene do receptor de somatostatina 4 será discutido no item 7.2.1.

#### **6.1.7 Rede de interação entre os genes diferencialmente expressos entre as linhagens SHR e Wistar**

Com o intuito de conhecer tanto a via em que os genes encontrados estavam inseridos, como os seus mecanismos de interação e regulação, nós construímos uma rede de interação utilizando o programa MetaCore™ (Thomson Reuters®, New York, EUA). Como apenas o CPF apresentou mais de um gene diferencialmente expresso (*Gad2*, *Chrb4*, *Slc5a7* e *Qrfpr*) essa abordagem só foi possível nesse tecido. Optamos por excluir o gene *Qrfpr* dessa análise devido aos poucos trabalhos sobre a função desse gene e também por ele não estar sabidamente envolvido com nenhuma via de interesse em esquizofrenia. A Figura 5 demonstra essa rede de conexão.



**Figura 5.** Figura gerada a partir do *Software* MetaCore™ mostrando a conexão entre os genes diferencialmente expressos no CPF (*Chrb4*, *Gad2* e *Slc5a7*) do SHR em relação ao Wistar. Setas vermelhas: inibição. Setas verdes: ativação. Setas cinza: outro tipo de interação. B= ligação (*binding*). +P= fosforilação; TR= transcrição.

 Enzima; 
  Protease; 
  Quinase; 
  Transportador; 
  Ligante acoplado a canal iônico; 
  Fator de Transcrição; 
  Receptor;

Os genes *Gad2* e *Chrn4* (representados como receptores nicotínicos em geral) estão conectados por meio da proteína beta-arrestina e do fator de transcrição CREB1. Por outro lado, a conexão entre os genes *Chrn4* e *Slc5a7* (representado como *CHT1*) é mais complexa, envolvendo diversos fatores de transcrição, enzimas e proteínas, como por exemplo a proteína precursora da beta-amilóide (APP).

A rede de interação que compreende os genes relevantes deste trabalho mostra a presença de diversos fatores de transcrição (FT), os quais podem sugerir uma implicação celular mais ampla. A beta-arrestina aparece no centro desta interação ativando e inibindo diversos FT e outras moléculas. Após a recepção colinérgica, o receptor nicotínico fosforila a beta-arrestina, a qual pode agir como mensageiro intracelular, carregando o sinal até o núcleo [103]. Na conexão *Chrn4* - *Gad2*, a beta-arrestina interage com o CREB, o qual é um dos FTs presente no promotor do gene *Gad2* [104]. Como sugerido anteriormente em nosso estudo e na literatura [105], o SHR parece ter um déficit na neurotransmissão colinérgica. Assim, essa hipofunção pode estar envolvida na desregulação da via GABAérgica, restringindo a expressão de *Gad2* e, consequentemente, a síntese de GABA.

Na conexão *Chrn4* – *Slc5a7*, a beta-arrestina interage com a proteína precursora da beta amilóide (APP) por meio de diferentes vias, sendo quatro inibitórias e duas estimulatórias. A APP é responsável pela formação das placas senis na doença de Alzheimer. Wang et al. (2007) encontraram que a perda de APP acarreta uma localização aberrante de CHT em sinapses neuromusculares e ainda redução da atividade do CHT nas projeções colinérgicas [100]. Novamente, essa desregulação na via colinérgica, somadas às possíveis alterações na APP, podem ser responsáveis pelo déficit cognitivo da linhagem SHR. Futuros trabalhos devem verificar a expressão gênica e proteica desses intermediários (beta-arrestina e a APP) no CPF do SHR e também em quais genes relacionados a esquizofrenia esses FTs podem agir.

## 6.2 Correlação sangue e regiões cerebrais

Em nossa análise, apenas o Tacr3 mostrou-se significante na correlação entre o sangue e as regiões cerebrais no grupo SHR tratado com veículo. Interessantemente, nós encontramos correlação negativa com o CPF e positiva com o NAcc. Nossos achados sugerem que o Tacr3 pode ser um potencial biomarcador para prever a expressão gênica no CPF e NAcc do SHR. Como dito anteriormente, o Tacr3 está emergindo como um possível alvo para novas drogas antipsicóticas. Contudo, novos estudos devem verificar se essa correlação também ocorre em humanos e se o tratamento com drogas antagonistas de Tacr3 afetam a sua expressão.

## 6.3 Genes diferencialmente expressos entre SHR tratado e não tratado com antipsicótico

### 6.3.1 *Sstr4*

A somatostatina está amplamente distribuída pelo corpo e exerce diversas funções [106-108]. Modificações dos níveis de somatostatina já foram relatadas em diversos distúrbios neurológicos, como nas doenças de Alzheimer, Huntington, Parkinson, depressão e epilepsia [109-113].

Acredita-se que os interneurônios somatostatinérgicos do hipocampo modulem os processos de memória e aprendizagem [92]. Em pacientes com esquizofrenia foi encontrado recentemente uma diminuição da densidade de interneurônios somatostatinérgicos e dos níveis de expressão gênica da somatostatina [91]. Em nosso trabalho ainda não verificamos o padrão de expressão gênica no hipocampo dos ratos. Desta forma, nós podemos apenas supor que a expressão diminuída encontrada no sangue dos ratos SHR em relação aos ratos Wistar podem estar relacionadas aos déficits nos testes de memória. Com relação à diferença de expressão no

CPF entre SHR tratado com veículo e com haloperidol não encontramos nada na literatura ligando a somatostatina a efeito de drogas antipsicóticas. Entretanto, essa alteração sugere que a alta afinidade antagonista de D2 do haloperidol pode estar influenciando a expressão gênica de outros neurotransmissores e receptores.

### 6.3.2 *Brs3*

A bombesina é um neuropeptídeo que ativa três tipos diferentes de receptores acoplados a proteína G, Brs1, Brs2, Brs3. Sabe-se que a bombesina modula o funcionamento de diversas vias como a dopaminérgica, gabaérgica e colinérgica [114]. Pacientes com esquizofrenia apresentam níveis de bombesina diminuída no líquido cefaloraquidiano e na urina [82, 83]. A administração crônica de antipsicótico leva ao ganho de peso de mais de 50% dos pacientes [115]. Devido ao importante papel na regulação do metabolismo energético, homeostase da glucose e controle da insulina plasmática, sugeriu-se que o Brs3 participasse no ganho de peso decorrente do uso de antipsicóticos [116-118]. Porém, Theisen et al. (2006) verificaram que a clozapina e haloperidol não faziam ligação com esse receptor [84]. Mesmo assim, devido à ligação múltipla dos antipsicóticos aos receptores de neurotransmissores, o efeito terapêutico e os efeitos adversos, como o ganho de peso, podem depender da combinação dos receptores ocupados por eles [119].

Em modelos animais, foi verificado que camundongos com deficiência de Brs3 apresentam um comportamento estereotipado [86] e que antagonistas desse receptor Brs3 bloqueiam a estereotipia causada por agonistas D1 e D2 [85], demonstrando a relação deste receptor com a via dopaminérgica. Além disso, Yamada et al. (2000) encontraram que camundongos com deficiência de BRS3 apresentam menor interação social após isolamento,

demonstrando que a deficiência desse receptor no sistema nervoso central pode afetar o mecanismo neural que regula os efeitos do isolamento social [86].

Desta forma, acreditamos que as alterações encontradas no CPF estão diretamente ligadas ao tratamento com os antipsicóticos clozapina e haloperidol. Anteriormente, nosso grupo verificou que a interação social dos ratos SHR melhorava após o uso de antipsicótico e que o grupo tratado com clozapina apresentava maior interação que os outros grupos de tratamento (quetiapina e haloperidol) [68]. Assim, as alterações encontradas do gene *Brs3* podem estar associadas à melhora no teste de interação social após o uso de clozapina e haloperidol.

Quanto ao ganho de peso, encontramos em todos os grupos de tratamento um aumento considerável do início até o sacrifício dos animais. Isto deve-se, provavelmente, ao desenvolvimento normal do rato durante a idade em que eles se encontravam, considerando que esse ganho de peso é esperado para o período de um mês. Não foi observado um maior aumento nos grupos tratados com antipsicótico, sugerindo que a alteração na expressão desse gene não leva a um ganho de peso nos ratos.

Novos estudos precisam verificar esta interação entre via dopaminérgica e receptor de bombesina, para melhor entender esta diferença de expressão encontrada aqui e em pacientes com esquizofrenia, já que as drogas antipsicóticas não apresentam ligação direta com esses receptores.

### 6.3.3 *Prima1*

A função da proteína PRiMA1 (*Proline rich membrane anchor 1*) é ancorar a enzima acetilcolinesterase (AChE) à membrana plasmática, a qual irá degradar a acetilcolina extracelular. Sabe-se que a maioria da AChE no sistema nervoso central está na forma tetramérica acoplada à PRiMA [120, 121]. Em camundongos *knockout* para *Prima1*, a *Ache* tem

expressão normal, mas sua proteína permanece no retículo endoplasmático e não é mais direcionada para o Complexo de Golgi e membrana extracelular, demonstrando que a PRiMA, embora não interfira na expressão gênica de *Ache*, controla diretamente sua função [122, 123]. A enzima AChE é também muito estudada na doença de Alzheimer, uma vez que esta enzima se liga fortemente à APP tornando-a ainda mais neurotóxica [124]. Dessa forma, um maior entendimento da função de PRiMA e sua relação com AChE podem auxiliar no estudo da DA [120].

Na literatura, encontramos que os antipsicóticos podem acarretar alterações na via colinérgica. A clozapina, por exemplo, aumenta a liberação de acetilcolina no CPF medial, NAcc e estriado; o haloperidol apenas no estriado; e a risperidona apenas no CPF medial [87-90]. Porém, somente a clozapina, dos antipsicóticos que utilizamos, pode apresentar ação agonista ou antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos [125]. Embora o haloperidol não tenha afinidade por receptores colinérgicos, sugere-se que antagonistas D2 (antipsicótico) são capazes de inibir a atividade da colinesterase no plasma e regiões cerebrais, agindo indiretamente na via colinérgica [126]. Uma das hipóteses sugere que o antagonismo de D2 leva a um aumento dos níveis de prolactina, a qual é capaz de inibir a atividade da colinesterase [127, 128], explicando assim o aumento de ACh encontrado após o tratamento com antipsicóticos.

Em nosso estudo, encontramos um aumento da expressão gênica ( $FR > 1,68$ ), embora não estatisticamente significante, de *Primal* no NAcc nos três grupos tratados com antipsicótico, e no CPF dos ratos SHR tratados com clozapina e haloperidol. Esta alteração demonstra que os antipsicóticos estão de fato agindo na via colinérgica. Seibt e colaboradores encontram em cérebro de *zebrafish* que o uso de antipsicóticos (olanzapina e haloperidol) diminuía a atividade da AChE, mas aumentava o número de mRNA de *Ache* [129]. Da mesma forma, mesmo que contra-intuitivo, esse aumento na expressão gênica de *Primal* pode indicar uma deficiência na atividade da AChE em degradar a ACh da fenda sináptica. Porém, é importante dizer que a



expressão gênica da *Ache* não foi alterada após os tratamentos, e que esta hipótese deve ser confirmada através de estudos de expressão protéica e funcionabilidade da AchE no SHR após o tratamento com antipsicóticos.

#### 6.3.4 *Drd2* e *Drd3*

Como mencionado anteriormente, os antipsicóticos têm alta afinidade antagonista pelos receptores D2. Sabe-se que a clozapina apresenta alta afinidade pelo receptor D3 e o haloperidol maior afinidade pelo receptor D2. Em nosso estudo encontramos que ambos os genes estão hipoeexpressos no CPF (região mais rica em receptores D1) dos animais tratados com clozapina e haloperidol, embora a significância tenha sido observada apenas no grupo tratado com clozapina. Padin et al. (2006) encontraram que o tratamento em ratos com olanzapina (antipsicótico atípico) leva a uma redução da densidade de receptores D3 no córtex [130]. Por outro lado, outros estudos encontraram baixa expressão basal de D3 no córtex frontal de ratos [131, 132] e, com frequência, um aumento da expressão de receptores dopaminérgicos após o tratamento com antipsicóticos [133, 134]. Estudos demonstraram ainda que os receptores D3 agem sobre a atividade locomotora de roedores [135], mas que o tratamento com antipsicóticos não altera sua expressão [136].

Os dados da literatura são conflitantes quanto a diferença de expressão em receptores de dopamina após tratamento com antipsicóticos, isto deve ocorrer devido as diferentes abordagens dos estudos quanto ao tempo de tratamento, antipsicótico utilizado e linhagem animal, de qualquer forma, a diferença de expressão em receptores de dopamina (*D2-like*) sugere que essas drogas estão de fato agindo na via dopaminérgica do SHR, e modificando sua expressão gênica.

#### 6.4 Limitações do estudo

- 1) O estudo de expressão gênica nem sempre reflete a expressão proteica, esta última não investigada neste trabalho, o que de certa forma, pode dificultar a relação genótipo-fenótipo.
- 2) Tanto a condição hipertensiva, como a falta de um animal controle ideal para o SHR [137] podem ser fatores confundidores nos nossos resultados de expressão gênica.
- 3) A correção para múltiplas comparações pode aumentar o risco de resultado falso-negativo, conduzindo a uma perda de dados com grande sentido biológico sem significância estatística (erro do tipo II). Curiosamente, na comparação entre os grupos SHR tratado com veículo e SHR tratado com haloperidol o gene *Glr1* possuía um valor de p no teste-T menor que os genes *Brs3* e *Sstr4*, entretanto, após a correção FDR o gene *Glr1* perdeu a significância e os genes *Brs3* e *Sstr4* se mantiveram significantes. Isto deve ter ocorrido devido ao nosso N amostral baixo de apenas 8 ou 7 animais por grupo.

## 7 CONCLUSÃO

### Comparação SHR x Wistar

Em nosso trabalho, encontramos cinco genes diferencialmente expressos no CPF e um no sangue entre as linhagens Wistar e SHR, alguns diretamente relacionados com a esquizofrenia, como o *Gad2* e o *Tacr3*, outros possivelmente relacionados à condição hipertensiva do SHR e aos testes comportamentais encontrados anteriormente por nosso grupo, como os genes *Qrfpr*, *Chrn4* e *Slc5a7*. No NAcc nós não encontramos genes estatisticamente significantes entre as linhagens.

### Comparação SHR tratado e não tratado

Com relação aos antipsicóticos administrados, encontramos três genes diferencialmente expressos no CPF do grupo SHR tratado com clozapina (*Brs3*, *Drd2* e *Drd3*) e dois no grupo SHR tratado com haloperidol (*Brs3* e *Sstr4*), mostrando, assim, que esses genes devem, de alguma forma, participar da resposta ao tratamento. Além disso, o gene *Prnal* mostrou um FR elevado em todos os tratamento no NAcc e nos grupos tratados com clozapina e haloperidol no CPF, sugerindo que os antipsicóticos atuam na via colinérgica do SHR.

### Correlação sangue-cérebro

Na correlação dos genes diferencialmente expresso entre as linhagem Wistar e SHR, encontramos que a expressão no sangue do gene *Tacr3* está correlacionado negativamente com o CPF e positivamente com o NAcc do SHR, despontando assim, como um potencial biomarcador da condição fenotípica desta linhagem. Já, na correlação entre sangue e cérebro, independente da linhagem e do tratamento, não encontramos nenhum gene correlacionado nos três grupos estudados.

## **Conclusão geral**

Em linhas gerais, este estudo demonstrou que o modelo SHR apresenta alterações nas vias GABAérgica (*Gad2*), colinérgica (*Slc5a7*, *Chrb4*) e de neuropeptídeos (*Tacr3*) semelhantes ao encontrado em esquizofrenia, e que podem estar associadas ao seu comportamento em relação a linhagem Wistar. Além disso, o gene *Tacr3* mostrou-se um potencial biomarcador da condição estudada.

Após o tratamento com antipsicóticos, o SHR apresentou diferença na expressão de genes, possivelmente, relacionados à resposta, mostrando uma melhora nos comportamentos de interação social e de cognição e de genes, intimamente, ligados ao antagonismo das drogas, como o *Drd2* e *Drd3*.

Os próximos estudos do nosso grupo devem focar na confirmação desses dados, verificando se os mesmos ocorrem ao nível proteico e se os efeitos de antagonistas *Tacr3* reverterem o comportamento do SHR.

## 8 ANEXOS

### 8.1 Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP (processo 1157/10)



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 8 de Outubro de 2010.  
CEP 1157/10

Ilmo(a): Sr(a):  
Pesquisador(a) MARCOS LEITE SANTORO  
Co-Investigadores: Sirlia Iole Nogueira Balangero; Marília de Arruda Cardoso Smith (orientadora); Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno; Rodrigo Afonseca Bressan; Vanessa Costhek Abilio;  
Disciplina/Departamento: Genética da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: FAPESP

#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Análise da expressão de genes de receptores e reguladores de neurotransmissores em modelo animal para esquizofrenia".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental crônico em ratos SHR e Wistar, machos de 05 meses (n=60).

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Comparação entre ratos das linhagens Wistar e SHR tratados e não tratados com antipsicóticos típico (haloperidol) e atípico (clozapina) quanto à expressão de genes de receptores e reguladores de neurotransmissores. Comparação dos resultados obtidos nos dois tecidos analisados; sangue periférico e tecido cerebral (córtex pré-frontal dorsolateral e núcleo accumbens). A correlação entre todos os achados, de forma que eles possam ser traduzidos da pesquisa para a prática médica, beneficiando tanto a terapêutica quanto a conduta clínica da esquizofrenia.

RESUMO: Serão utilizados 30 ratos SHR machos, 5 meses e 30 ratos Wistar, machos, 5 meses. Eutanásia: decapitação. Serão constituídos 2 grupos: 1- animais SHR tratados com: haloperidol, clozapina e controle; 2- animais Wistar tratados com: haloperidol, clozapina e controle. Os animais serão tratados com injeções diárias de veículo ou de antipsicótico por 30 dias. Por via i.p.. Após este período serão submetidos ao teste de medo condicionado ao contexto, inibição pré-pulso ou interação social para avaliação comportamental. Imediatamente após essa avaliação, os animais serão sacrificados e será coletado sangue periférico e regiões do cérebro para a avaliação da expressão gênica. Será realizada extração de DNA e RNA do tecido cerebral. Serão quantificados por RT-PCR em tempo real, a expressão de 64 genes de receptores e reguladores de neurotransmissores, que incluem genes das vias de acetilcolinérgica, dopaminérgica, GABAérgica, glutamatérgica, serotoninérgica e genes de metabolismo de neurotransmissores. Serão incluídos genes endógenos para normalização dos dados de modo comparativo, além de controles que avaliam a presença de DNA genômico contaminante, qualidade do RNA utilizado e eficiência da reação.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Este projeto tem como finalidade a investigação de marcadores genéticos e epigenéticos para o tratamento da esquizofrenia por meio do estudo da expressão, do padrão de metilação e de polimorfismos de genes de receptores e reguladores de neurotransmissores, tanto para pacientes esquizofrênicos em primeiro episódio psicótico, quanto para modelos animais de esquizofrenia, antes e após o tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos do estudo. Este projeto integra um Projeto Interdisciplinar amplo, envolvendo os Departamentos de Morfologia e Genética e de Psiquiatria da UNIFESP, o Departamento de Psiquiatria da USP/SP e Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da USP/Ribeirão.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto.

**CRONOGRAMA:** Adequado.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Mestrado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 03/10/11 e 02/10/12.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1157/90

## 8.2 Anexo II - Artigo submetido ao periódico Schizophrenia Bulletin

Schizophrenia Bulletin. For Peer Review Only



Draft Manuscript for Review. Please review online at <http://mc.manuscriptcentral.com/oup/szbltn>

### Expression Profile of Neurotransmitter Receptor and Regulatory Genes in a New Animal Model of Schizophrenia

Journal:	<i>Schizophrenia Bulletin</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Regular Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Santoro, Marcos; Federal University of São Paulo, Morphology and Genetics Santos, Camila; UNIFESP, Psychiatry Ota, Vanessa; UNIFESP, Morfologia e Genética Gadelha, Ary; UNIFESP, Psychiatry Diana, Mariana; UNIFESP, Silva, Patricina Mrad, Vinicius Spindola, Leticia; UNIFESP, Morphology and Genetics Mari, Jair Melaraqno, Maria Smith, Marilia Bressan, Rodriqo Abilio, Vanessa; UNIFESP, Psychiatry Belangero, Sintia
Keywords:	SHR, Chrnb4, Gad2, Slc5a7, Qrfpr, Tacr3

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<http://www.schizophreniabulletin.oupjournals.org>

## **Expression Profile of Neurotransmitter Receptor and Regulatory Genes in a New Animal Model of Schizophrenia**

### **Running title: Expression of neurotransmission genes in SHR**

Marcos Leite Santoro<sup>1,2,\*</sup>, Camila Mauricio Santos<sup>2,3</sup>, Vanessa Kiyomi Ota<sup>1,2</sup>, Ary Gadelha<sup>2,3</sup>, Mariana Ceppolaro Diana<sup>2,4</sup>, Patrícia Natália Silva<sup>1</sup>, Vinícius Colonese Mraz<sup>1</sup>, Leticia Maria Nery Spíndola<sup>1</sup>, Jair Jesus Mari<sup>2,3</sup>, Maria Isabel Melaragno<sup>1</sup>, Marília de Arruda Cardoso Smith<sup>1</sup>, Rodrigo Bressan<sup>2,3</sup>, Vanessa Costhek Abílio<sup>2,4</sup>, Sintia Iole Belangero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Interdisciplinary Laboratory of Clinical Neurosciences (LiNC), Sao Paulo, Brazil

<sup>3</sup> Department of Psychiatry, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

<sup>4</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

\* Corresponding author

Disciplina de Genética / UNIFESP

Rua Botucatu, 740, Ed. Leita da Cunha, 1º andar

CEP 04023-900, Sao Paulo, Brazil

Tel: +(5511) 5576-4260 / +(5511) 5576-4264

E-mail: sinogueira@gmail.com (S.I. Belangero)

Word count for the Abstract: 201

Word count for the text body: 2870



**Abstract**

Recently, we suggested that the spontaneously hypertensive rat (SHR) strain could be a useful animal model to study several aspects of schizophrenia. The aims of the present study were to characterize the gene expression profiles of neurotransmitter receptors and regulators in the prefrontal cortex (PFC) and nucleus accumbens (NAcc) of SHR compared with Wistar rats (control group). Additionally, we searched for functional interactions between the differentially expressed genes using MetaCore analyses. Moreover, to identify potential biomarkers, we correlated the genes' expression in the PFC and NAcc with that in peripheral blood. We performed gene expression analysis using PCRarray technology, which simultaneously measures the expression of 84 genes related to neurotransmission. Four genes were significantly downregulated in the PFC in SHR compared with Wistar rats (*Gad2*, *Chrb4*, *Slc5a7*, and *Qrfpr*). *Tacr3* was significantly downregulated in the SHR PFC and upregulated in the NAcc. Moreover, SHR *Tacr3* expression in the peripheral blood was positively correlated with that in the NAcc, and was negatively correlated with that in the PFC. In summary, we identified genes that are downregulated in the PFC of SHR that show functional interconnections and may be related to the behavioral profile of these rats. *Tacr3* is a new candidate biomarker.

**Key words:** SHR, *Gad2*, *Chrb4*, *Tacr3*, *Qrfpr*, *Slc5a7*.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Barbato A. Schizophrenia and public health. World Health Organization (WHO) 1998 [cited; Available from: [http://www.who.int/mental\\_health/resources/schizophrenia/en/index.html](http://www.who.int/mental_health/resources/schizophrenia/en/index.html)].
- [2] McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC medicine*. 2004 Apr 28;2:13.
- [3] Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Jun;62(6):617-27.
- [4] Mathers CD, Lopez AD, Murray CJL. The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001. In: Lopez AD, Mathers CD, Majid E, Jamison DT, Murray CJL, eds. *Global Burden of Disease and Risk Factors*. New York: Oxford University Press 2006:45-240.
- [5] Rossler W, Salize HJ, van Os J, Riecher-Rossler A. Size of burden of schizophrenia and psychotic disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005 Aug;15(4):399-409.
- [6] Wu EQ, Birnbaum HG, Shi L, Ball DE, Kessler RC, Moulis M, et al. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2002. *J Clin Psychiatry*. 2005 Sep;66(9):1122-9.
- [7] Leitao RJ, Ferraz MB, Chaves AC, Mari JJ. Cost of schizophrenia: direct costs and use of resources in the State of Sao Paulo. *Revista de saude publica*. 2006 Apr;40(2):304-9.
- [8] Daltio CS, Mari JJ, Ferraz MB. Direct medical costs associated with schizophrenia relapses in health care services in the city of Sao Paulo. *Revista de saude publica*. 2011 Feb;45(1):14-23.
- [9] McGue M, Gottesman, II. The genetic epidemiology of schizophrenia and the design of linkage studies. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 1991;240(3):174-81.
- [10] Roos JL. Genetics of schizophrenia: communicating scientific findings in the clinical setting. *African journal of psychiatry*. 2011 Jun;14(2):105-11.
- [11] Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of general psychiatry*. 2003 Dec;60(12):1187-92.
- [12] Cannon TD, Kaprio J, Lonnqvist J, Huttunen M, Koskenvuo M. The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study. *Arch Gen Psychiatry*. 1998 Jan;55(1):67-74.
- [13] Lichtenstein P, Yip BH, Bjork C, Pawitan Y, Cannon TD, Sullivan PF, et al. Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet*. 2009 Jan 17;373(9659):234-9.
- [14] Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*. 2005 Jan;10(1):40-68; image 5.
- [15] Sullivan PF. The genetics of schizophrenia. *PLoS medicine*. 2005 Jul;2(7):e212.

- [16] Gill M, Donohoe G, Corvin A. What have the genomics ever done for the psychoses? *Psychol Med.* 2010 Apr;40(4):529-40.
- [17] Ota VK, Belangero SI, Gadelha A, Bellucco FT, Christofolini DM, Mancini TI, et al. The UFD1L rs5992403 polymorphism is associated with age at onset of schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2010 Nov;44(15):1113-5.
- [18] Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse (New York, NY.* 1987;1(2):133-52.
- [19] Kapur S, Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. *Am J Psychiatry.* 2001 Mar;158(3):360-9.
- [20] Angrist B, vanKammen DP. CNS stimulants as a tool in the study of schizophrenia. *Trends in neurosciences.* 1984;7:388-90.
- [21] Talkowski ME, Kirov G, Bamne M, Georgieva L, Torres G, Mansour H, et al. A network of dopaminergic gene variations implicated as risk factors for schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 2008 Mar 1;17(5):747-58.
- [22] Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophrenia bulletin.* 2009 May;35(3):549-62.
- [23] Leonard S, Gault J, Hopkins J, Logel J, Vianzon R, Short M, et al. Association of promoter variants in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2002 Dec;59(12):1085-96.
- [24] Stephens SH, Logel J, Barton A, Franks A, Schultz J, Short M, et al. Association of the 5'-upstream regulatory region of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (CHRNA7) with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2009 Apr;109(1-3):102-12.
- [25] Freedman R, Hall M, Adler LE, Leonard S. Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1995 Jul 1;38(1):22-33.
- [26] Guan ZZ, Zhang X, Blennow K, Nordberg A. Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport.* 1999 Jun 3;10(8):1779-82.
- [27] Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, et al. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry.* 2000 Nov;57(11):1061-9.
- [28] Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L, et al. Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet.* 2008 Mar;82(3):696-711.
- [29] Gaddum JH, Hameed KA. Drugs which antagonize 5-hydroxytryptamine. *British journal of pharmacology and chemotherapy.* 1954 Jun;9(2):240-8.
- [30] Meltzer HY. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology.* 1999 Aug;21(2 Suppl):106S-15S.
- [31] Matsumoto I, Inoue Y, Iwazaki T, Pavey G, Dean B. 5-HT2A and muscarinic receptors in schizophrenia: a postmortem study. *Neurosci Lett.* 2005 May 13;379(3):164-8.
- [32] Werkman TR, McCreary AC, Kruse CG, Wadman WJ. NK3 receptors mediate an increase in firing rate of midbrain dopamine neurons of the rat and the guinea pig. *Synapse (New York, NY.* 2011 Aug;65(8):814-26.

- [33] Dasgupta S, Li XM, Jansson A, Finnman UB, Matsui T, Rinken A, et al. Regulation of dopamine D2 receptor affinity by cholecystokinin octapeptide in fibroblast cells cotransfected with human CCKB and D2L receptor cDNAs. *Brain research*. 1996 Mar;36(2):292-9.
- [34] Sasayama D, Hattori K, Teraishi T, Hori H, Ota M, Yoshida S, et al. Negative correlation between cerebrospinal fluid oxytocin levels and negative symptoms of male patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2012 Aug;139(1-3):201-6.
- [35] Rubin LH, Carter CS, Drogos L, Pournajafi-Nazarloo H, Sweeney JA, Maki PM. Peripheral oxytocin is associated with reduced symptom severity in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2010 Dec;124(1-3):13-21.
- [36] Dawson LA, Smith PW. Therapeutic utility of NK3 receptor antagonists for the treatment of schizophrenia. *Current pharmaceutical design*. 2010 Jan;16(3):344-57.
- [37] Morris HM, Stopczynski RE, Lewis DA. NPY mRNA expression in the prefrontal cortex: Selective reduction in the superficial white matter of subjects with schizoaffective disorder. *Schizophrenia research*. 2009 Dec;115(2-3):261-9.
- [38] Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet*. 2004 Nov;75(5):807-21.
- [39] Uchida H, Suzuki T, Mamo DC, Mulsant BH, Tanabe A, Inagaki A, et al. Effects of age and age of onset on prescribed antipsychotic dose in schizophrenia spectrum disorders: a survey of 1,418 patients in Japan. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2008 Jul;16(7):584-93.
- [40] Rosenbloom M. Chlorpromazine and the psychopharmacologic revolution. *Jama*. 2002 Apr 10;287(14):1860-1.
- [41] Lopez-Munoz F, Alamo C. Neurobiological background for the development of new drugs in schizophrenia. *Clinical neuropharmacology*. 2011 May-Jun;34(3):111-26.
- [42] Kapur S, Seeman P. Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D2 receptors. Implications for atypical antipsychotic action. *J Psychiatry Neurosci*. 2000 Mar;25(2):161-6.
- [43] Farde L, Nordstrom AL. PET analysis indicates atypical central dopamine receptor occupancy in clozapine-treated patients. *The British journal of psychiatry*. 1992 May(17):30-3.
- [44] Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S. Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000 Apr;157(4):514-20.
- [45] Crossley NA, Constante M, McGuire P, Power P. Efficacy of atypical v. typical antipsychotics in the treatment of early psychosis: meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2010 Jun;196(6):434-9.
- [46] Woodward ND, Purdon SE, Meltzer HY, Zald DH. A meta-analysis of neuropsychological change to clozapine, olanzapine, quetiapine, and risperidone in schizophrenia. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*. 2005 Sep;8(3):457-72.
- [47] Uchida H, Takeuchi H, Graff-Guerrero A, Suzuki T, Watanabe K, Mamo DC. Predicting dopamine D(2) receptor occupancy from plasma levels of antipsychotic drugs: a systematic review and pooled analysis. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2011 Jun;31(3):318-25.

- [48] Klemp M, Tvette IF, Skomedal T, Gaasemyr J, Natvig B, Aursnes I. A review and Bayesian meta-analysis of clinical efficacy and adverse effects of 4 atypical neuroleptic drugs compared with haloperidol and placebo. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2011 Dec;31(6):698-704.
- [49] Guidance on the Use of Newer (Atypical) Antipsychotic Drugs for the Treatment of Schizophrenia. *National Institute for Clinical Excellence*. London: National Institute for Clinical Excellence (NICE) 2001:2001:21.
- [50] Grohmann R, Ruther E, Sassim N, Schmidt LG. Adverse effects of clozapine. *Psychopharmacology*. 1989;99 Suppl:S101-4.
- [51] Sequeira PA, Martin MV, Vawter MP. The first decade and beyond of transcriptional profiling in schizophrenia. *Neurobiology of disease*. 2012 Jan;45(1):23-36.
- [52] Molteni R, Calabrese F, Racagni G, Fumagalli F, Riva MA. Antipsychotic drug actions on gene modulation and signaling mechanisms. *Pharmacology & therapeutics*. 2009 Oct;124(1):74-85.
- [53] Kurian SM, Le-Niculescu H, Patel SD, Bertram D, Davis J, Dike C, et al. Identification of blood biomarkers for psychosis using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry*. 2011 Jan;16(1):37-58.
- [54] Kuzman MR, Medved V, Terzic J, Krainc D. Genome-wide expression analysis of peripheral blood identifies candidate biomarkers for schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2009 Sep;43(13):1073-7.
- [55] Zvara A, Szekeres G, Janka Z, Kelemen JZ, Cimmer C, Santha M, et al. Over-expression of dopamine D2 receptor and inwardly rectifying potassium channel genes in drug-naïve schizophrenic peripheral blood lymphocytes as potential diagnostic markers. *Disease markers*. 2005;21(2):61-9.
- [56] Zhang HX, Zhao JP, Lv LX, Li WQ, Xu L, Ouyang X, et al. Explorative study on the expression of neuregulin-1 gene in peripheral blood of schizophrenia. *Neurosci Lett*. 2008 Jun 13;438(1):1-5.
- [57] Perl O, Ilani T, Strous RD, Lapidus R, Fuchs S. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in schizophrenia: decreased mRNA levels in peripheral blood lymphocytes. *Faseb J*. 2003 Oct;17(13):1948-50.
- [58] Glatt SJ, Everall IP, Kremen WS, Corbeil J, Sasik R, Khanlou N, et al. Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15533-8.
- [59] Bertolino A, Caforio G, Blasi G, Rampino A, Nardini M, Weinberger DR, et al. COMT Val158Met polymorphism predicts negative symptoms response to treatment with olanzapine in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2007 Sep;95(1-3):253-5.
- [60] Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *The New England journal of medicine*. 2003 Feb 6;348(6):529-37.
- [61] Swartz MS, Perkins DO, Stroup TS, Davis SM, Capuano G, Rosenheck RA, et al. Effects of antipsychotic medications on psychosocial functioning in patients with chronic schizophrenia: findings from the NIMH CATIE study. *Am J Psychiatry*. 2007 Mar;164(3):428-36.

- [62] Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*. 1984;83(1):1-16.
- [63] Willner P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 1986;10(6):677-90.
- [64] Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, et al. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3 $\beta$ /beta-catenin signaling. *Cell*. 2009 Mar 20;136(6):1017-31.
- [65] Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *American journal of human genetics*. 2002 Oct;71(4):877-92.
- [66] Angelucci F, Brene S, Mathe AA. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Molecular psychiatry*. 2005 Apr;10(4):345-52.
- [67] Levin R, Calzavara MB, Santos CM, Medrano WA, Niigaki ST, Abilio VC. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2011 Aug 15;35(7):1748-52.
- [68] Calzavara MB, Medrano WA, Levin R, Kameda SR, Andersen ML, Tufik S, et al. Neuroleptic drugs revert the contextual fear conditioning deficit presented by spontaneously hypertensive rats: a potential animal model of emotional context processing in schizophrenia? *Schizophrenia bulletin*. 2009 Jul;35(4):748-59.
- [69] Calzavara MB, Levin R, Medrano WA, Almeida V, Sampaio AP, Barone LC, et al. Effects of antipsychotics and amphetamine on social behaviors in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural brain research*. 2011 Nov 20;225(1):15-22.
- [70] Krawiec JA, Chen H, Alom-Ruiz S, Jaye M. Modified PAXgene method allows for isolation of high-integrity total RNA from microlitre volumes of mouse whole blood. *Laboratory animals*. 2009 Oct;43(4):394-8.
- [71] Paxinos G WC. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 1998.
- [72] Butte AJ, Dzau VJ, Glueck SB. Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues". *Physiological genomics*. 2001 Dec 21;7(2):95-6.
- [73] Calzavara MB, Levin R, Medrano WA, Almeida V, Sampaio AP, Barone LC, et al. Effects of antipsychotics and amphetamine on social behaviors in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural brain research*. Nov 20;225(1):15-22.
- [74] Levin R, Calzavara MB, Santos CM, Medrano WA, Niigaki ST, Abilio VC. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. Aug 15;35(7):1748-52.
- [75] Dawson LA, Cato KJ, Scott C, Watson JM, Wood MD, Foxton R, et al. In vitro and in vivo characterization of the non-peptide NK3 receptor antagonist SB-223412 (talnetant): potential therapeutic utility in the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jun;33(7):1642-52.

- [76] Lessard A, Laurin M, Yamaguchi N, Couture R. Central anti-hypertensive effect of tachykinin NK3 receptor antagonists in rat. *European journal of pharmacology*. 2004 Feb 13;486(1):75-83.
- [77] Volk DW, Austin MC, Pierri JN, Sampson AR, Lewis DA. Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2000 Mar;57(3):237-45.
- [78] Straub RE, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, et al. Genome-wide scans of three independent sets of 90 Irish multiplex schizophrenia families and follow-up of selected regions in all families provides evidence for multiple susceptibility genes. *Mol Psychiatry*. 2002;7(6):542-59.
- [79] Heldt SA, Green A, Ressler KJ. Prepulse inhibition deficits in GAD65 knockout mice and the effect of antipsychotic treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Sep;29(9):1610-9.
- [80] Okuda T, Konishi A, Misawa H, Haga T. Substrate-induced internalization of the high-affinity choline transporter. *J Neurosci*. 2011 Oct 19;31(42):14989-97.
- [81] Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides*. 2006 May;27(5):1073-86.
- [82] Gerner RH, van Kammen DP, Ninan PT. Cerebrospinal fluid cholecystokinin, bombesin and somatostatin in schizophrenia and normals. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 1985;9(1):73-82.
- [83] Olincy A, Leonard S, Young DA, Sullivan B, Freedman R. Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Jan;20(1):52-9.
- [84] Theisen FM, Haberhausen M, Firnges MA, Gregory P, Reinders JH, Remschmidt H, et al. No evidence for binding of clozapine, olanzapine and/or haloperidol to selected receptors involved in body weight regulation. *The pharmacogenomics journal*. 2007 Aug;7(4):275-81.
- [85] Meller CA, Henriques JA, Schwartzmann G, Roesler R. The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. *Peptides*. 2004 Apr;25(4):585-8.
- [86] Yamada K, Ohki-Hamazaki H, Wada K. Differential effects of social isolation upon body weight, food consumption, and responsiveness to novel and social environment in bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) deficient mice. *Physiology & behavior*. 2000 Feb;68(4):555-61.
- [87] Ichikawa J, Chung YC, Li Z, Dai J, Meltzer HY. Cholinergic modulation of basal and amphetamine-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain research*. 2002 Dec 20;958(1):176-84.
- [88] Ichikawa J, Dai J, O'Laughlin IA, Fowler WL, Meltzer HY. Atypical, but not typical, antipsychotic drugs increase cortical acetylcholine release without an effect in the nucleus accumbens or striatum. *Neuropsychopharmacology*. 2002 Mar;26(3):325-39.
- [89] Ikarashi Y, Takahashi A, Ishimaru H, Arai T, Maruyama Y. Suppression of cholinergic activity via the dopamine D2 receptor in the rat striatum. *Neurochemistry international*. 1997 Feb;30(2):191-7.

- [90] Kuroki T, Meltzer HY, Ichikawa J. Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1999 Feb;288(2):774-81.
- [91] Konradi C, Yang CK, Zimmerman EI, Lohmann KM, Gresch P, Pantazopoulos H, et al. Hippocampal interneurons are abnormal in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2011 Sep;131(1-3):165-73.
- [92] DeNoble VJ, Hepler DJ, Barto RA. Cysteamine-induced depletion of somatostatin produces differential cognitive deficits in rats. *Brain research*. 1989 Mar 13;482(1):42-8.
- [93] Erlander MG, Tobin AJ. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochemical research*. 1991 Mar;16(3):215-26.
- [94] Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*. 1998 Dec;19(12):500-5.
- [95] Tian N, Petersen C, Kash S, Baekkeskov S, Copenhagen D, Nicoll R. The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal gamma-aminobutyric acid release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12911-6.
- [96] Winterer G, Mittelstrass K, Giegling I, Lamina C, Fehr C, Brenner H, et al. Risk gene variants for nicotine dependence in the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 cluster are associated with cognitive performance. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010 Dec 5;153B(8):1448-58.
- [97] Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci*. 2000 Feb;3(2):120-5.
- [98] Hahn MK, Blackford JU, Haman K, Mazei-Robison M, English BA, Prasad HC, et al. Multivariate permutation analysis associates multiple polymorphisms with subphenotypes of major depression. *Genes Brain Behav*. 2008 Jun;7(4):487-95.
- [99] English BA, Hahn MK, Gizer IR, Mazei-Robison M, Steele A, Kurnik DM, et al. Choline transporter gene variation is associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of neurodevelopmental disorders*. 2009 Dec;1(4):252-63.
- [100] Wang B, Yang L, Wang Z, Zheng H. Amyloid precursor protein mediates presynaptic localization and activity of the high-affinity choline transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 28;104(35):14140-5.
- [101] Matsuo A, Bellier JP, Nishimura M, Yasuhara O, Saito N, Kimura H. Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a high-affinity choline transporter. *The Journal of biological chemistry*. 2011 Feb 18;286(7):5836-45.
- [102] Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, et al. A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Nov 21;278(47):46387-95.
- [103] Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, et al. A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell*. 2005 Dec 2;123(5):833-47.
- [104] Makinae K, Kobayashi T, Kobayashi T, Shinkawa H, Sakagami H, Kondo H, et al. Structure of the mouse glutamate decarboxylase 65 gene and its promoter: preferential expression of its promoter in the GABAergic neurons of transgenic mice. *Journal of neurochemistry*. 2000 Oct;75(4):1429-37.



- [105] Li DJ, Evans RG, Yang ZW, Song SW, Wang P, Ma XJ, et al. Dysfunction of the cholinergic anti-inflammatory pathway mediates organ damage in hypertension. *Hypertension*. 2011 Feb;57(2):298-307.
- [106] Thoss VS, Duc D, Hoyer D. Somatostatin receptors in the developing rat brain. *European journal of pharmacology*. 1996 Feb 15;297(1-2):145-55.
- [107] ten Bokum AM, Hofland LJ, van Hagen PM. Somatostatin and somatostatin receptors in the immune system: a review. *European cytokine network*. 2000 Jun;11(2):161-76.
- [108] Pinter E, Helyes Z, Szolcsanyi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacology & therapeutics*. 2006 Nov;112(2):440-56.
- [109] Vezzani A, Hoyer D. Brain somatostatin: a candidate inhibitory role in seizures and epileptogenesis. *The European journal of neuroscience*. 1999 Nov;11(11):3767-76.
- [110] Vecsei L, Klivenyi P. Somatostatin and Alzheimer's disease. *Archives of gerontology and geriatrics*. 1995 Jul-Aug;21(1):35-41.
- [111] Norris PJ, Waldvogel HJ, Faull RL, Love DR, Emson PC. Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease. *Neuroscience*. 1996 Jun;72(4):1037-47.
- [112] Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C. The neurobiology of somatostatin. *Critical reviews in neurobiology*. 1994;8(1-2):25-44.
- [113] Bissette G, Myers B. Somatostatin in Alzheimer's disease and depression. *Life sciences*. 1992;51(18):1389-410.
- [114] Hsu LL, Yu JR, Upp JR, Jr., Glass EJ, Townsend CM. Chronic bombesin treatment increased the [3H]spiperone binding, glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase activity in the rat brain. *Brain Res*. 1987 Aug 11;417(2):232-8.
- [115] Baptista T. Body weight gain induced by antipsychotic drugs: mechanisms and management. *Acta psychiatrica Scandinavica*. 1999 Jul;100(1):3-16.
- [116] Nakamichi Y, Wada E, Aoki K, Ohara-Imaizumi M, Kikuta T, Nishiwaki C, et al. Functions of pancreatic beta cells and adipocytes in bombesin receptor subtype-3-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004 Jun 4;318(3):698-703.
- [117] Ohki-Hamazaki H, Watase K, Yamamoto K, Ogura H, Yamano M, Yamada K, et al. Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature*. 1997 Nov 13;390(6656):165-9.
- [118] Weber HC. Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2009 Feb;16(1):66-71.
- [119] Seeman P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Canadian journal of psychiatry*. 2002 Feb;47(1):27-38.
- [120] Henderson Z, Matto N, John D, Nalivaeva NN, Turner AJ. Co-localization of PRiMA with acetylcholinesterase in cholinergic neurons of rat brain: an immunocytochemical study. *Brain research*. 2010 Jul 16 2010;1344:34-42.
- [121] Massoulie J, Bon S, Perrier N, Falasca C. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chemico-biological interactions*. 2005 Dec 15;157-158:3-14.

- [122] Dobbertin A, Hrabovska A, Dembele K, Camp S, Taylor P, Krejci E, et al. Targeting of acetylcholinesterase in neurons in vivo: a dual processing function for the proline-rich membrane anchor subunit and the attachment domain on the catalytic subunit. *J Neurosci*. 2009 Apr 8;29(14):4519-30.
- [123] Perrier NA, Kherif S, Perrier AL, Dumas S, Mallet J, Massoulie J. Expression of PRiMA in the mouse brain: membrane anchoring and accumulation of 'tailed' acetylcholinesterase. *The European journal of neuroscience*. 2003 Oct;18(7):1837-47.
- [124] Inestrosa NC, Alvarez A, Calderon F. Acetylcholinesterase is a senile plaque component that promotes assembly of amyloid beta-peptide into Alzheimer's filaments. *Molecular psychiatry*. 1996 Nov;1(5):359-61.
- [125] Tandon R. Cholinergic aspects of schizophrenia. *The British journal of psychiatry*. 1999(37):7-11.
- [126] Nasello AG, Gidali D, Felicio LF. A comparative study of the anticholinesterase activity of several antipsychotic agents. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2003 Jul;75(4):895-901.
- [127] Drago F, Bohus B, Van Ree JM, Scapagnini U, De Wied D. Behavioral responses of long-term hyperprolactinaemic rats. *European journal of pharmacology*. 1982 Apr 23;79(3-4):323-7.
- [128] Ramaswamy S, Regunathan S, Bapna JS. Anticholinesterase activity of prolactin: correlation with analgesia. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1988 Apr;40(4):306-7.
- [129] Seibt KJ, Oliveira Rda L, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Typical and atypical antipsychotics alter acetylcholinesterase activity and AChE expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2009 Jul;150(1):10-5.
- [130] Padin JF, Rodriguez MA, Dominguez E, Dopeso-Reyes IG, Buceta M, Cano E, et al. Parallel regulation by olanzapine of the patterns of expression of 5-HT<sub>2A</sub> and D<sub>3</sub> receptors in rat central nervous system and blood cells. *Neuropharmacology*. 2006 Sep;51(4):923-32.
- [131] Baldessarini RJ, Tarazi FI. Brain dopamine receptors: a primer on their current status, basic and clinical. *Harvard review of psychiatry*. 1996 Mar-Apr;3(6):301-25.
- [132] Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, et al. Localization and function of the D<sub>3</sub> dopamine receptor. *Arzneimittel-Forschung*. 1992 Feb;42(2A):224-30.
- [133] Ilani T, Ben-Shachar D, Strous RD, Mazor M, Sheinkman A, Kotler M, et al. A peripheral marker for schizophrenia: Increased levels of D<sub>3</sub> dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 16;98(2):625-8.
- [134] Kwak YT, Koo MS, Choi CH, Sunwoo I. Change of dopamine receptor mRNA expression in lymphocyte of schizophrenic patients. *BMC medical genetics*. 2001;2:3.
- [135] McNamara RK, Levant B, Taylor B, Ahlbrand R, Liu Y, Sullivan JR, et al. C57BL/6J mice exhibit reduced dopamine D<sub>3</sub> receptor-mediated locomotor-inhibitory function relative to DBA/2J mice. *Neuroscience*. 2006 Nov 17;143(1):141-53.
- [136] Tarazi FI, Zhang K, Baldessarini RJ. Long-term effects of olanzapine, risperidone, and quetiapine on dopamine receptor types in regions of rat brain: implications for antipsychotic drug treatment. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2001 May;297(2):711-7.

- [137] Sagvolden T, Johansen EB, Woien G, Walaas SI, Storm-Mathisen J, Bergersen LH, et al. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacology*. 2009 Dec;57(7-8):619-26.

## 10 ABSTRACT

Recently, our group demonstrated that *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) strain presents a behavioral profile, classically, associated with schizophrenia animal models. The aim of this study was to characterize the expression of neurotransmitter receptors and regulators genes in brain regions (*nucleus accumbens* – NAcc and prefrontal cortex - CPF) and peripheral blood between SHR (N=8) and Wistar rats (control strain) (N=8), and between SHR animals treated or not with antipsychotic drugs (risperidone – N=8, clozapine – N=7, haloperidol – N=7). We used the PCRarray technology, which verifies the gene expression of 84 genes simultaneously. In the comparison between SHR and Wistar strains we found 4 genes differentially expressed in CPF (*Chrn4*, *Gad2*, *Qrfpr* e *Slc5a7*) and one in peripheral blood (*Sstr4*). We also observed that the gene expression of *Tacr3* in peripheral blood of SHR was positively correlated with NAcc and negatively with CPF of SHR animals. Concerning the treatment, we found three genes differentially expressed in CPF of SHR group treated with clozapine (*Drd2*, *Drd3* e *Brs3*) and two in SHR group treated with haloperidol (*Brs3* e *Sstr4*). In this study, we encountered genes differentially expressed between SHR and Wistar that are involved in important pathways of schizophrenia, such as *Gad2* and *Tacr3*, and the latter, also correlated between blood and brain, suggesting a potential biomarker of SHR condition. In the treatment groups, we found genes probably altered due to the antagonism of D2-like receptors, and genes that can be associated with behavioral improvements after antipsychotic treatment, described previously by our group. In conclusion, our study revealed that SHR strain exhibit genetic resemblances with schizophrenia, and in addition, we pointed out a potential biomarker and new genes, possibly, involved in SHR phenotype.

## 11 FONTES CONSULTADAS

- Stahl, Stephen M. Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas / Stephen M. Stahl; com ilustrações de Nancy Munter; assistente editorial Meghan M. Grady; supervisão da edição brasileira Irismar Reis de Oliveira e Eduardo Pondé de Sena. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 3ª edição.
- HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), EMBL Outstation - Hinxton, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK [www.genenames.org](http://www.genenames.org). Aug 2012.
- Some homology data for this paper were retrieved from the Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web (URL: <http://www.informatics.jax.org>). Aug 2012.
- Michaelis – Moderno Dicionário da Língua Portuguesa. Editor: Walter Weiszflög. © 1998-2007 Editora Melhoramentos Ltda.
- Michaelis –Guia prático da nova ortografia. Douglas Tufano Professor e autor de livros didáticos de língua portuguesa. © 2008 Editora Melhoramentos Ltda. Diagramação: WAP Studio. ISBN: 978-85-06-05464-2. 2.ª edição, abril de 2009.

## 12 APÊNDICES

Artigos publicados e submetidos como co-autor durante o período do mestrado.

### 12.1 Apêndice I – Artigo aceito para publicação

Elsevier Editorial System(tm) for Schizophrenia Research  
Manuscript Draft

Manuscript Number: SCHRES-D-12-00401

Title: DRD1 rs4532 polymorphism: a potential pharmacogenomic marker for treatment response to antipsychotic drugs

Article Type: Brief Report

Keywords: schizophrenia, DRD1, rs4532, pharmacogenomics

Corresponding Author: Dr Sintia Iole Belangero, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Federal University of Sao Paulo

First Author: Vanessa Kiyomi Ota

Order of Authors: Vanessa Kiyomi Ota; Leticia N Spindola; Ary Gadelha; Airton F Santos-Filho; Marcos L Santoro; Denise M Christofolini; Fernanda T Bellucco; Andrea K Ribeiro-dos-Santos; Sidney Santos; Jair J Mari; Maria I Melaragno; Rodrigo A Bressan; Marilia Smith; Sintia Iole Belangero, Ph.D

Abstract: We investigated the association of dopamine receptor D1 gene (DRD1) rs4532 polymorphism with antipsychotic treatment response in schizophrenia. We have analyzed 124 patients with schizophrenia, consisting of 59 treatment resistant (TR) and 65 non-TR. We found an association between G-allele and TR schizophrenia ( $p=0.001$ ;  $OR=2.71$ ). Setting the common AA-genotype as reference, the GG-homozygous presented a five-fold risk compared to AA-homozygous ( $p=0.010$ ;  $OR=5.56$ ) with an intermediate result for AG-genotype ( $p=0.030$ ;  $OR=2.64$ ). The DRD1 rs4532 polymorphism showed a dose-response gradient with increased risk for treatment resistance and may be a potential pharmacogenetic marker for antipsychotic drugs treatment response.

Suggested Reviewers: Quirino Cordeiro  
qcordeiro@yahoo.com

Camila Guindalini  
camilascg@googlemail.com

Beverly Emanuel  
beverly@mail.med.upenn.edu

## 12.2 Apêndice II - Artigo submetido

Elsevier Editorial System(tm) for Neuroscience Letters  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Gene Expression of Neurotransmitter Receptors and Regulators in Peripheral Blood of a Drug Naïve First-Episode Psychosis sample before and after treatment

Article Type: Research Paper

Keywords: gene expression, PCR array, first-episode psychosis, schizophrenia, Peripheral blood

Corresponding Author: Miss Vanessa Kiyomi Ota, Msc

Corresponding Author's Institution: UNIFESP

First Author: Vanessa Kiyomi Ota, Msc

Order of Authors: Vanessa Kiyomi Ota, Msc; Cristiano S Noto, MD; Ary Gadelha, MD; Marcos L Santoro, Bsc; Patrícia N Silva, Msc; Quirino Cordeiro, PhD; Jair J Mari, PhD; Maria I Melaragno, PhD; Marília A Smith, PhD; Rodrigo A Bressan, PhD; Sintia I Belangero, PhD

**Abstract:** The study of gene expression levels in peripheral blood may yield biomarkers for mental disorders, which will be of great value because brain tissue is not readily accessible. Little is known about which genes are expressed in blood; this can lead to wasted resources and loss of statistical power. In this pilot study, we compared the expression of neurotransmitter receptor and regulatory genes in whole blood of eight first-episode psychosis (FEP) patients and seven healthy controls, aiming to identify non-expressed genes and those that would be of interest for further analysis in a larger sample. Whole blood was drawn from patients during clinical evaluations at admission and after 8 weeks of treatment. Gene expression was assessed with a RT2 Profiler™ PCR Array System, which interrogates 84 neurotransmitter receptor and regulatory genes, and the genes were grouped according to their threshold cycle values. In the control group, the proportions of genes with high, medium, and low expression were 1.19%, 15.48%, and 64.29%, respectively. In the FEP group, the proportions were 1.19%, 16.67%, and 59.52%, and after treatment, they were 1.19%, 14.86%, and 60.71%, respectively. Fifteen genes were undetectable in all three groups: CHRNA4, GABRA2, GABRB2, GABRE, GABRG1, GABRP, GABRR1, GALR1, QRFP, NPFFR2, GRIA1, HTR2A, NPY1R, NPY2R, and SSTR1. DRD2 was not expressed in the control and FEP groups; GABRA3, GALR3, and HTR1B were not expressed in the FEP and "after treatment" groups. GLRA2 and PROKR1 were undetectable only in the "after treatment" group. We believe that the report of preliminary results of non-expression can be very helpful to future studies to define the best investigation techniques in terms of equipment and target tissue.

## 12.3 Apêndice III - Artigo submetido

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Psychiatric Research  
Manuscript Draft

Manuscript Number: JPR3454

Title: Candidate genes for schizophrenia in a mixed Brazilian population using pooled DNA

Article Type: Original Article

Keywords: CNV; RET; DNA pooling; schizophrenia

Corresponding Author: Miss Vanessa Kiyomi Ota, Bsc

Corresponding Author's Institution:

First Author: Vanessa Kiyomi Ota, Bsc

Order of Authors: Vanessa Kiyomi Ota, Bsc; Ary Gadelha, MD; Renata Pellegrino, MS; Marcos L Santoro, Bsc; Fernanda T Bellucco, PhD; Denise M Christofolini, PhD; Diogo R Lara, PhD; Gustavo L Ottoni, PhD; Andrea K Ribeiro-dos-Santos, PhD; Sidney Santos, PhD; Jair J Mari, PhD; Gerome Breen, PhD; Marília A Smith, PhD; Rodrigo A Bressan, PhD; Maria I Melaragno, PhD; Sintia I Belangero, PhD

**Abstract:** Schizophrenia is a complex and heterogeneous disease with a worldwide prevalence of 0.3-1.6%. One of the most important genetic risk factors for schizophrenia is the 22q11.2 deletion, a copy number variation (CNV). In this study, we aimed to investigate common CNVs in different samples of the Brazilian population using single nucleotide polymorphism arrays in DNA pools. A total of 212 patients with schizophrenia and 120 healthy controls were submitted to a clinical evaluation and blood collection. DNA was isolated for population structure analysis and copy number variation analysis followed by dilution and quantification. Population structure was assessed using a panel of 48 Ancestry Informative INDELs. DNA pools were hybridized to Affymetrix 6.0 microarrays and two different analyses were performed (PennCNV and Partek Suite-Segmentation). Finally, copy number variations were considered using both analyses and when they overlapped among different DNA pools of patients and compared to controls. Our results revealed amplification in the previous schizophrenia associated 10q11.21 chromosome region and suggested other two novel chromosome regions: 2p11.2 and 14q32.33. In particular, the most interesting gene is RET (10q11.21), which have a functional biological role in brain. Therefore, using a cost-effective methodology, we could confirm the association of chromosome 10q11.21 with schizophrenia in two ethnically distinct Brazilian populations and suggest two other chromosome regions and genes for further investigation in schizophrenia.



## 12.4 Apêndice IV - Artigo submetido

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Psychiatric Research  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Distinct polymorphisms in schizophrenia candidate gene UFD1L may contribute to different cognitive deficits

Article Type: Original Article

Keywords: UFD1L; schizophrenia; working memory; executive functions, verbal memory; cognition; gene

Corresponding Author: Miss Vanessa Kiyomi Ota, Bsc

Corresponding Author's Institution:

First Author: Vanessa Kiyomi Ota, Bsc

Order of Authors: Vanessa Kiyomi Ota, Bsc; Arthur A Berberian, PhD; Ary Gadelha, MD; Denise M Christofolini, PhD; Marcos L Santoro, Bsc; Fernanda T Bellucco, PhD; Airton F Santos-Filho, MD; Gustavo L Ottoni, PhD; Diogo R Lara, PhD; Jair J Mari, PhD; Maria I Melaragno, PhD; Marília A Smith, PhD; Sintia I Belangero, PhD; Rodrigo A Bressan, PhD

**Abstract:** Background: There is evidence suggesting that variations within the 22q11.2 region are involved in the etiology and/or cognitive impairments of schizophrenia. The UFD1L gene, located at this region, encodes the human homolog of the yeast ubiquitin-fusion-degradation 1 protein. The aim of this study was to investigate the association of UFD1L rs5992403, rs1547931 and rs5746744 polymorphisms with schizophrenia and to evaluate their role in cognitive performance of patients. Methods: A total of 309 cases and 388 healthy controls have undergone a detailed psychiatric interview and were genotyped using TaqMan-probe based real-time PCR and RFLP-PCR techniques. Association of these polymorphisms with schizophrenia was verified by logistic regression analysis. For the neuropsychological assessment, 130 patients were assessed by a battery of nine tests addressing different aspects of executive functions, working memory and memory. Results: No association between each genotype and schizophrenia was found ( $p > 0.05$ ). Regarding relationship between polymorphisms and cognitive performance, AA-genotype carriers showed lower scores on mental set shifting, complex executive function, and a marginally significant tendency to poorer performance on working memory. Moreover, GG carriers showed a tendency to deficits in verbal delayed recall memory. Conclusions: It is possible that AA genotype carriers of the rs5992403, which was previously associated to early-onset schizophrenia, may influence performance of some abilities related to executive control, whereas SNPs in rs5746744 and rs1547931 may have a specific impact on verbal memory. In conclusion, the UFD1L gene may play an important role in the core cognitive deficits observed in schizophrenia.